



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Enquête prospective multifactorielle :
influence des agents microbiens et parasitaires, et des résidus de pesticides
sur le devenir de colonies d'abeilles domestiques
en conditions naturelles

Rédaction: **Michel AUBERT¹, Jean-Paul FAUCON¹, Marie-Pierre CHAUZAT¹**

Responsables scientifiques : **Jean-Paul FAUCON¹, Michel AUBERT¹, Marie-Pierre CHAUZAT¹**

Méthodes Statistiques :

Patrice CARPENTIER², Stéphanie BOUGEARD³, François MADEC³

Prélèvements et Diagnostics des Maladies de l'Abeille :

**Nicolas COUGOULE¹, Marie-Pierre CHAUZAT¹, Jean-Paul FAUCON¹,
Patrick DRAJNUDEL¹**

Analyses Polliniques : **Marie-Claude CLEMENT¹**

Analyses Physico-Chimiques : **Anne-Claire MARTEL¹, Philippe PORTA¹, Julie LACHAIZE¹**
et **GIRPA** (Groupement Interrégional sur les Recherches des Produits
Agropharmaceutiques, Angers)

Validation des Méthodes mises au point par le GIRPA :

CEST (Comité scientifique et technique des troubles des abeilles)

Étude de l'environnement des ruchers :

**Services décentralisés de la Protection des Végétaux du Gard, du Gers,
de l'Indre et de l'Yonne**

Support terrain : **Vingt-quatre apiculteurs volontaires**

**Les Directions des Services Vétérinaires de l'Eure, du Gard, du Gers,
de l'Indre et de l'Yonne**

Financement : **AFSSA, DGAI et Fonds FEOGA**

¹AFSSA LERPRA Les Templiers, 105 route des Chappes, B.P. 111 – F-06 902 Sophia-Antipolis cedex France.

²AFSSA DIVE 10, rue Pierre Curie – 94 704 Maisons-Alfort cedex France.

³AFSSA LERAPP BP 53– 22 440 Ploufragan France.

RESUME	3
INTRODUCTION	4
1. MATERIEL ET METHODES	4
1.1. Protocole général	4
1.2. Récolte des échantillons	5
1.3. Évaluation de la population adulte	5
1.4. Diagnostic des maladies et identification des agents pathogènes.....	5
1.5. Analyses physico-chimiques	5
- Insecticides et fongicides dans le miel	6
- Insecticides et fongicides dans le pollen	6
- Insecticides dans la cire.....	7
- Insecticides et fongicides dans les abeilles	7
1.6. Méthodes d'analyses et d'interprétation statistiques.	8
- Définition des variables	8
- Traitement des données.....	9
2. RESULTATS	10
2.1. Niveaux de population.....	10
2.2. Maladies et agents pathogènes.....	10
- Présence de maladies ou d'agents pathogènes	10
- Le traitement contre la varroase et la conduite des ruchers	10
- Maladie et agents pathogènes versus population : modélisation	11
- Maladie et agents pathogènes versus mortalité.....	11
2.3. Résidus de pesticides et fongicides	11
- Distribution des résidus de pesticides dans les matrices apicoles.....	11
- Détection simultanée de différents résidus dans les matrices	12
- Etude des liens entre la présence de résidus dans les matrices	12
3. DISCUSSION	13
3.1. Méthodologie : plan d'expérience et interprétation.	13
3.2. Mortalités	13
3.3. Maladies et agents pathogènes.....	14
3.4. Les résidus de pesticides.....	15
CONCLUSIONS.....	16
REMERCIEMENTS.....	16

RESUME

Une étude de terrain conduite de 2002 à 2005 a porté sur 120 colonies d'abeilles domestiques dans 24 ruchers répartis en France métropolitaine. L'objectif était de contribuer à la recherche des causes des mortalités de colonies d'abeilles grâce au suivi de plusieurs paramètres caractéristiques de la santé des colonies : niveau de population, état sanitaire, présence de pesticides dans la ruche, pratiques apicoles, mortalité des colonies et des abeilles.

La mortalité hivernale et la mortalité lors de la saison apicole sont toujours restées inférieures à 10% dans l'ensemble des 24 ruchers observés pendant les trois années qu'a duré l'étude. Ce taux se situe dans l'intervalle des mortalités considéré comme non exceptionnel en apiculture.

Parmi les sept maladies, anomalies ou agents pathogènes recherchés, six ont été communément retrouvés dans les ruchers : la mycose à *Ascosphaera apis* (dans 73 à 87% des ruchers examinés en 2003 - 2005), le couvain chauve (96 à 100%), des spores de *Nosema sp.* (50 à 79%), la varroase (35 à 46%), la loque américaine (32 à 39%), la loque européenne (18 à 29%). De manière statistiquement significative, le diagnostic des loques ou de la varroase dans une colonie a été suivi par la mort de la colonie – de manière rapide (mort constatée lors de la visite suivante) pour les loques, ou différée (deux ou trois visites après le diagnostic) pour la varroase. D'une manière générale, l'attention consacrée par l'apiculteur aux mesures préventives, à la détection précoce et à l'identification de la varroase ont été des points critiques en relation statistiquement significative avec la mortalité des colonies.

La relation entre la présence de résidus de pesticides dans les matrices apicoles et la santé des colonies a été particulièrement examinée. Quand les résultats de toutes les matrices prélevées étaient rassemblés, le nombre de résidus par visite de rucher variait entre 0 et 9. Les visites de rucher dont les résultats pour la recherche de résidus montraient 2 pesticides différents étaient les plus fréquentes (26,9%). Aucun résidu n'a été détecté dans les échantillons récoltés lors de 12,7% des visites. Parmi toutes les molécules recherchées, les échantillons contenant des résidus d'imidaclopride et d'acide 6-chloronicotinique étaient les plus fréquents dans la matrice pelote de pollen, la matrice miel et la matrice abeille. La présence simultanée dans les abeilles et les pelotes de pollen (même visite x rucher) de certaines substances est apparue significativement corrélée. La corrélation entre la présence de résidus de la même molécule dans des matrices différentes au même moment a été statistiquement démontrée pour le groupe fipronil et dans une moindre mesure pour le groupe imidaclopride. Cependant il faut noter que ces résultats statistiques sont basés sur un très petit nombre d'observations. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur la dynamique de répartition de ces résidus au sein de la colonie à partir de ces résultats. Aucune relation statistique entre la présence de résidus et les populations d'abeille adultes et larvaires, ni avec la mortalité des colonies n'a pu être mise en évidence.

Il importe enfin de rappeler que le protocole mis en place ne permettait de mettre en évidence que des variations importantes des populations des colonies suivies.

Introduction

En France, depuis les années 90, l'attention a été attirée sur les mortalités croissantes de colonies d'abeilles, qu'il s'agisse de mortalités hivernales ou de mortalités survenues en cours de saison apicole. Pour contribuer à situer l'origine de ces problèmes, nous avons proposé en 2002 (journée Afssa du 10 septembre 2002) un protocole de suivi prospectif. Il s'agissait de suivre plusieurs paramètres caractéristiques du statut des colonies et d'étudier leur relation avec d'autres facteurs : présence d'agents pathogènes à un seuil induisant des manifestations pathologiques ou des maladies déclarées, présence de pesticides dans la ruche, pratiques apicoles et pratiques agricoles dans un périmètre de 1,5 km autour des ruchers. Les premiers résultats obtenus sur la présence de pesticides dans les pelotes de pollen et dans la cire ont déjà été publiés (Chauzat *et al.* 2006, Chauzat & Faucon 2007). Pour l'ensemble des colonies d'abeilles suivies pendant trois ans, ce rapport présente les résultats obtenus sur la mise en évidence des agents pathogènes et/ou des maladies les plus sévères pour l'abeille, la mise en évidence de résidus de pesticides dans les différentes matrices étudiées, les variations concomitantes de la population d'abeilles adultes et de couvain et la mortalité des colonies. Les relations entre ces différents paramètres ont été étudiées et analysées.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Protocole général

25 ruchers répartis dans 5 départements de France métropolitaine (Eure, Gard, Gers, Indre et Yonne : 5 ruchers par département) ont été suivis. Ils étaient représentatifs de sites de production apicole variés. Les miellées dominantes étaient le tournesol, le colza, et "toutes fleurs" sauvages et cultivées. Dans chacun des départements, le choix des ruchers a été décidé sur la base du volontariat des apiculteurs. Ceux-ci étaient de statuts différents (professionnels ou amateurs) et propriétaires d'exploitations de taille hétérogène (de 15 à 1 500 ruches). Pour les besoins de l'étude, les apiculteurs étaient censés conserver leur pratique habituelle à l'exception de la transhumance. Celle-ci n'était en effet pas compatible avec le protocole qui prévoyait un suivi en parallèle de la végétation et des cultures dans un périmètre de 1,5 km autour de l'implantation des ruchers¹.

Avant de commencer l'étude, pour des raisons éthiques et malgré le biais que cela ne manquerait pas d'introduire dans la représentativité des ruchers suivis, nous avons décidé de donner des conseils de prophylaxie et de gestion aux apiculteurs lorsque ceux-ci seraient demandeurs ou lorsque des problèmes évidents susceptibles de mettre en péril leur rucher seraient observés au cours de l'étude.

Dans chacun des ruchers, cinq colonies à suivre tout au long de l'étude ont été tirées au sort. Pendant le projet, un apiculteur a décidé de quitter l'étude, ce qui a limité le nombre de ruchers suivis à 24. Afin de garder constant le nombre de colonies suivies (120), toute colonie morte a été remplacée par une autre colonie choisie au hasard dans le même rucher.

Les ruchers ont été visités une première fois à l'automne 2002, puis quatre fois par an jusqu'en 2005 incluse : immédiatement après l'hiver (mars-avril, visite A), avant l'été (mai-juin, visite B), pendant l'été (juillet – août, visite C) et avant l'hiver (octobre – novembre, visite D). A chaque visite, avant d'ouvrir les ruches suivies, on a noté la mortalité devant celles-ci. Le trou de vol a été enfumé modérément pour ne pas déstabiliser la grappe. On a procédé à un examen clinique complet de la colonie, et à des prélèvements. Au cours de ces visites, les apiculteurs ont été interrogés sur leur pratique apicole. Assurés de notre confidentialité, ils se sont engagés à nous fournir toute information nécessaire à notre suivi et en particulier à nous prévenir en cas d'évènements graves. Tous les traitements – en particulier les traitements contre le varroa - ont été notés. A l'automne 2003, des lanières Apivar® ont été distribuées gratuitement aux apiculteurs qui souhaitaient utiliser ce traitement pour les colonies suivies.

Toutes les visites ont été effectuées par une personne (plus généralement deux personnes) parmi les trois chargées de ces visites du laboratoire de Sophia-Antipolis.

¹ Les résultats de ce suivi sont en cours d'analyse et feront l'objet de rapports ultérieurs.

1.2. Récolte des échantillons

Dans toutes les ruches suivies, nous avons prélevé - des abeilles adultes vivantes lors de toutes les visites, - du miel lors des visites B, C et D, - de la cire lors de la visite D seulement. Des pelotes de pollen ont été prélevées à toutes les visites lorsque les conditions le permettaient. Au sein de chaque rucher suivi, deux colonies supplémentaires étaient équipées de trappes à pollen mises en fonction deux à trois jours avant la visite. Les abeilles adultes ont été prélevées directement en secouant un cadre au-dessus d'une enveloppe en papier. On a utilisé de préférence un cadre de rive pour accroître la probabilité d'obtenir des butineuses.

1.3. Évaluation de la population adulte

La population des colonies suivies a été évaluée : a) pour les abeilles adultes : par le nombre d'inter-cadres occupés par des abeilles adultes, y compris les inter-cadres des hausses quand les ruches en étaient équipées. Ce décompte a été fait immédiatement après avoir ôté le couvre cadre après l'enfumage limité; b) pour la population non-adulte par le nombre de cadres occupés par du couvain operculé ou non operculé.

1.4. Diagnostic des maladies et identification des agents pathogènes

On a cherché à identifier les symptômes des maladies ou les anomalies suivantes : loque américaine, loque européenne, couvain plâtré à *Ascosphaera apis* (Spiltoir et Olive 1955) (que nous désignerons par "mycose" dans la suite du texte), couvain chauve (ou couvain tubulaire) causé par la petite teigne de la cire *Achroia grisella* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), une forte infestation² par *Varroa destructor* Anderson et Trueman (Acari: Varroidae) caractérisée par des varroas phorétiques et des abeilles adultes aux ailes déformées (Borchert 1970). Le couvain présentant des symptômes de loque a fait l'objet de prélèvements pour confirmer ce diagnostic au laboratoire. Les indices tels que présence/absence d'œufs, cannibalisme, couvain en mosaïque, diarrhées ont également été notés.

On a recherché systématiquement au laboratoire sur les abeilles adultes : l'acarbose des trachées (*Acarapis woodi*), la présence de spores de *Nosema sp.* (Fungi: Microsporidiae), et l'on a confirmé au laboratoire le diagnostic des loques américaine et européenne. Les méthodes utilisées ont été celles recommandées par l'OIE (OIE 2000a), (OIE 2000c) et (OIE 2000b).

1.5. Analyses physico-chimiques

Pour les analyses physico-chimiques, les échantillons de chaque type de matrice ont été rassemblés et mélangés pour constituer un seul échantillon par visite et par rucher.

Toutes les recherches de résidus ont été effectuées au laboratoire du GIRPA (Groupement Interrégional sur les Recherches des Produits Agropharmaceutiques, Angers, France) à l'exception des analyses multirésidus pour les insecticides organophosphorés (OP), organochlorés (OC) et pyrèthrinoides (PYR) dans le pollen et les abeilles qui ont été assurées par le laboratoire de l'AFSSA Sophia-Antipolis. Au total, 41 molécules ont été recherchées (30 insecticides et 12 fongicides : voir Tableau 1) soit par des analyses spécifiques (imidaclopride et fipronil), soit par des analyses multirésidus. Les limites de détection et de quantification ont été déterminées selon le document guide : European Commission. *Guidance document on residue analytical methods*, Document N° SANCO/825/00 rev.6 (20/06/00). Les métabolites acide 6-chloronicotinique de l'imidaclopride et MB43136 et MB46513 du fipronil ont aussi été recherchés. Le choix de ces pesticides a été dicté par leur forte toxicité pour l'abeille ou par la fréquence de leur utilisation. Ces substances correspondent (ou correspondaient) à des spécialités dont l'usage agricole est (ou était)

² Tous les ruchers du territoire continental métropolitain sont contaminés par *V. destructor*. Dans la suite du texte, lorsque nous serons amenés à utiliser le terme "varroase" ou "infestation par le varroa", il faudra comprendre "forte infestation par le varroa".

autorisé à l'exception du lindane et du coumaphos. Cette dernière matière active est seulement utilisée pour le traitement (non autorisé) des colonies contre le varroa.

- Insecticides et fongicides dans le miel

Insecticides et fongicides ont été recherchés dans des échantillons de 5 g de miel qui ont été homogénéisés dans l'eau et purifiés sur cartouches Chem-Elut. Après évaporation à sec de l'éluat, l'extrait a été repris dans de l'acétate d'éthyle pour analyse en GC/MS/MS (1200 Quadripôle MS/MS, Varian) sur colonne CP-Sil 8 CB/MS (30 m, 0,25 mm x 0,25 µm) (Tableau 2). Le même extrait a été analysé en LC/MS/MS (1200L Quadripôle MS/MS, Varian) sur colonne type C18 (5 cm, 2 mm x 5 µm) pour la recherche des autres pesticides (carbamates, triazoles et iprodione). En 2003, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), données par le GIRPA, étaient de 2 µg/kg et 10 µg/kg respectivement pour tous les analytes à l'exception du tebuconazole, du parathion-méthyl, de l'hexaconazole, de la deltaméthrine et de l'azinphos-méthyl dont la LOQ a été de 20 µg/kg. En 2004 et 2005, les LOD et LOQ ont été de 5 µg/kg et 10 µg/kg pour tous les analytes sauf en 2005 pour le tebuconazole, le parathion-méthyl, l'hexaconazole, la deltaméthrine et l'azinphos-méthyl dont la LOQ était de 20 µg/kg.

L'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique ont été recherchés par des analyses spécifiques. Des échantillons de miel (20 g) ont été extraits à l'aide d'un mélange de méthanol et d'eau additionnés d'acide sulfurique dilué. Après homogénéisation et filtration, un aliquot a été concentré jusqu'à obtenir un résidu aqueux. Cet extrait a ensuite été dilué, lavé au *n*-hexane et purifié sur cartouche Amberlite® XAD-4. L'extrait obtenu a été divisé en deux parties égales, l'une servant à la recherche d'imidaclopride, l'autre pour les résidus totaux transformés en acide 6-chloronicotinique. Le premier aliquot a donc été concentré, dissout dans l'eau et purifié avec du dichlorométhane sur colonne Chem-Elut®. La quantification de l'imidaclopride a été assurée par une méthode LC/MS/MS (LOD = 0,3 µg/kg - LOQ = 1 µg/kg). Le second aliquot a été concentré et dissout dans l'eau. Ensuite, l'imidaclopride et tous les métabolites contenant la structure partielle 6-chloropicolyl ont été oxydés en acide 6-chloronicotinique. La solution a ensuite été acidifiée et les résidus d'acide 6-chloronicotinique ont été extraits de la phase aqueuse acide avec du tert-butyl-méthyl éther. La phase éther a été séchée et les résidus ont été repris dans un mélange de méthanol/eau acidifié pour être purifiés sur cartouche HLB®. La quantification a été réalisée en LC/MS/MS (LOD = 0,3 µg/kg – LOD = 0,62 µg/kg).

Le fipronil et ses métabolites, sulfone (MB46136) et désulfinyl (MB46513), ont aussi fait l'objet d'analyses spécifiques. Les échantillons de miel (5 g) ont subi une extraction à l'aide d'un mélange d'eau et de méthanol. Après évaporation, l'extrait a été purifié sur une cartouche immunologique (Fiprorep). Après évaporation, l'éluat a été repris dans un mélange d'eau et de méthanol pour analyse. Le fipronil et ses deux métabolites ont été quantifiés par LC/MS/MS. Au cours de l'étude, la LOD a diminué de 0,3 à 0,15 µg/kg et la LOQ de 2,0 à 0,5 µg/kg.

- Insecticides et fongicides dans le pollen

L'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique ont aussi fait l'objet d'analyses spécifiques. Le procédé d'extraction pour les échantillons de pollen (20 g) a été le même que celui utilisé pour le miel. La quantification a été faite par LC/MS/MS. Au cours de l'étude, la LOD a augmenté de 0,2 µg/kg à 0,3 µg/kg pour chacun des composés recherchés. La LOQ a été égale à 1 µg/kg et 0,62 µg/kg pour l'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique respectivement.

Le fipronil et ses deux métabolites ont aussi fait l'objet d'analyses spécifiques. Les échantillons de pollen (1 g) ont été extraits à l'acétone. Après homogénéisation et filtration, l'extrait a été évaporé à sec et le résidu a été repris dans le méthanol puis purifié sur cartouche d'alumine, puis sur cartouche immunologique (Fiprorep) comme pour le miel. Le fipronil et ses deux métabolites ont été quantifiés par LC/MS/MS avec une LOD de 0,3 µg/kg pour chacun de ces composés. Au cours de l'étude, leur LOQ a diminué de 2,0 à 0,5 µg/kg.

On a procédé à deux analyses multirésidus, l'une pour les carbamates et les fongicides, l'autre pour les insecticides OP, OC et PYR. Pour l'analyse des carbamates et fongicides, les échantillons de

pollen (2 g) ont été extraits à l'acétate d'éthyl. Après homogénéisation et filtration, l'extrait a été réparti en deux fractions qui ont été évaporées. Une fraction du résidu sec a été dissoute dans un mélange d'eau et méthanol, et l'autre fraction dans un mélange d'eau et méthanol additionné d'acétate de sodium. La quantification a été faite par LC/MS/MS. Les LOD et LOQ ont été de 5 µg/kg et 10 µg/kg respectivement pour tous les analytes sauf en 2003 pour l'hexaconazole et le tébuconazole dont les LOD et LOQ ont été de 10 µg/kg et 20 µg/kg respectivement. Pour l'analyse multirésidus des insecticides OP, OC et PYR, les échantillons de pollen (10 g) ont été extraits à l'acétone puis ont subi une séparation liquide/liquide avec du dichlorométhane. Une purification a été faite ensuite sur colonne de gel de silice. Les deux éluats obtenus ont été concentrés par évaporation à sec à l'évaporateur rotatif (bain-marie à 40°C environ). Les résidus ont été repris dans l'iso-octane pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (GC). L'analyse multirésidus a été faite par GC (Autosystem XL, Perkin Elmer) avec un détecteur à capture d'électrons (ECD) et sur colonne type DB-5 (30 m, 0,32 mm x 0,5 µm) pour les insecticides OC et PYR et avec un détecteur thermoionique (NPD) et sur colonne type DB-XLB (30 m, 0,25 mm x 0,25 µm) pour les insecticides organophosphorés. Selon les analytes recherchés, la LOD a varié de 0,1 à 57 µg/kg et la LOQ de 4 à 196,7 µg/kg (Tableau 3).

- Insecticides dans la cire

Les échantillons de cire (2 g) ont été extraits au n-hexane dans un bain à ultrasons (40°C). Après congélation à l'azote liquide et centrifugation, le surnageant a été repris et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (40°C) jusqu'à un volume d'environ 6 ml. Deux séparations liquide/liquide ont été réalisées avec un mélange hexane/acétonitrile. Les phases acétonitrile ont été réunies et concentrées à l'évaporateur rotatif. L'extrait (2 ml) a été purifié sur cartouche C18. Après élution dans un mélange acétonitrile/eau, 20 ml d'acétonitrile ont été ajoutés à l'éluat. La solution évaporée à sec a été reprise dans 1 ml d'acétate d'éthyl pour l'analyse en GC/MS/MS. La LOD a été de 5 µg/kg pour tous les composés recherchés et la LOQ de 20 µg/µg pour le parathion-méthyl et la deltaméthrine et de 10 µg/kg pour tous les autres composés. Au cours de l'étude, la LOQ du parathion-méthyl et de la deltaméthrine a été baissée de 20 à 10 µg/kg.

- Insecticides et fongicides dans les abeilles

Pour la recherche des carbamates et des fongicides, les échantillons d'abeilles ont subi le même procédé d'extraction que les échantillons de pollen. Les LOD et LOQ ont été de 5 µg/kg et 10 µg/kg respectivement pour tous les analytes à l'exception de l'hexaconazole et du tébuconazole en 2003 dont les LOD et LOQ ont été de 10 et 20 µg/kg respectivement. En 2004 et 2005, les LOD et LOQ de l'hexaconazole ont été abaissées de 5 à 10 µg/kg respectivement alors que pour le tébuconazole, les LOD et LOQ sont restées égales à 10 et 20 µg/kg respectivement. Au cours de l'étude, la LOD du carbofuran, du mercaptodiméthur et du sulfoxyde de mercaptodiméthur a baissé de 6,3 µg/kg à 5 µg/kg.

Pour l'analyse multirésidus des insecticides OP, OC et PYR, les échantillons d'abeilles ont été extraits à l'acétone, la séparation liquide/liquide a été faite avec du dichlorométhane et la purification de l'extrait a été réalisée sur cartouche florisil (1 g – 6 mL). Les deux fractions obtenues ont été évaporées à sec à l'évaporateur rotatif (à 40°C environ). Les résidus ont été repris dans l'iso-octane pour l'une, et dans l'acétone pour la deuxième. Les deux fractions ont été analysées en GC avec des détecteurs spécifiques (ECD et NPD). La LOD pour les différents analytes a été comprise entre 0,01 et 5,7 ng/abeille, et la LOQ entre 0,15 et 19,6 ng/abeille (Tableau 3).

L'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique ont été recherchés par des analyses spécifiques conduites sur les échantillons prélevés en 2004 et 2005. Le procédé d'extraction pour les échantillons d'abeilles (20 g) a été le même que celui utilisé pour le miel et le pollen. La quantification a été faite par LC/MS/MS avec une LOD de 0,3 µg/kg pour l'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique, et une LOQ de 1 µg/kg et de 0,62 µg/kg pour ces deux composés respectivement.

Le fipronil et ses deux métabolites ont aussi été recherchés par des analyses spécifiques conduites sur les échantillons prélevés en 2004 et 2005. Les échantillons d'abeilles (1 g) ont été extraits selon le même procédé que pour les échantillons de pollen. Ces produits ont été quantifiés par LC/MS/MS avec une LOD de 0,3 µg/kg et de 0,15 µg/kg respectivement en 2004 et 2005, et une LOQ de 0,5 µg/kg quelle que soit l'année.

1.6. Méthodes d'analyses et d'interprétation statistiques.

- Définition des variables

Deux niveaux épidémiologiques ont servi de base aux analyses : le rucher et la colonie. Les variables expliquées ont été le niveau de la population adulte, de la population du couvain, et enfin, la mortalité des colonies (Tableau 4). On a considéré une colonie morte quand (1) celle-ci a été trouvée vide de toute abeille adulte vivante au cours d'une visite ou (2) lorsque entre deux visites, l'apiculteur a fait cette observation, ou lorsqu'il a détruit volontairement la colonie (parce qu'elle était proche de sa fin) ou parce qu'il a déclaré avoir repeuplé la ruche avec un nouvel essaim, l'ayant trouvée vide. On a défini la mortalité hivernale par le pourcentage de colonies trouvées mortes lors de la visite post-hivernale (visite A) rapporté au nombre de colonies vivantes lors de la visite pré-hivernale (visite D). La mortalité en saison a été définie par le pourcentage de colonies trouvées mortes au cours de la saison apicole (visite B + visite C + visite D) rapporté au nombre de colonies vivantes au début de la saison apicole (visite A) additionné du nombre de colonies désignées par le sort pour remplacer les colonies mortes au cours de cette saison.

Les variables explicatives ont été selon le cas, la présence de maladies (avec symptômes) ou d'agents pathogènes (spores de *Nosema sp.*) et une variable synthétique caractérisant la conduite du rucher. On a considéré positive pour la variable infection par tel ou tel pathogène ou atteinte par telle ou telle maladie, toute colonie (ou rucher) où ce pathogène ou cette maladie ont été diagnostiqués une fois au moins au cours de l'année dans cette colonie (ou dans une colonie au moins de ce rucher). Lorsque cette maladie ou cet agent pathogène a été diagnostiqué dans une colonie de remplacement, ce cas a aussi été pris en compte. A l'échelle du rucher, la fréquence de la maladie ou de l'agent pathogène est représentée par le nombre total de colonies positives rapporté au nombre total de colonies soumises au diagnostic considéré (un diagnostic par colonie et par visite).

La variable synthétique a été définie consécutivement à un questionnaire soumis aux apiculteurs sur la conduite de leur rucher. Chacun des trois enquêteurs a ensuite indépendamment rempli un formulaire concernant (1) l'aptitude de l'apiculteur à identifier les symptômes des maladies les plus graves (loques américaine et européenne, varroase) et l'attention qu'il leur portait, (2) la qualité et la pertinence de la mise en œuvre des traitements préventifs contre la varroase, (3) la qualité et la pertinence de la démarche suivie par l'apiculteur en présence de symptômes de mycose ou de loques, (4) la gestion générale du rucher : hygiène du rucher (désinfection du matériel apicole), suivi des reines, connaissance et attention portée à l'environnement floristique du rucher, (5) l'organisation générale du rucher, le choix de son emplacement (ensoleillement, humidité). Pour chacun de ces critères, les enquêteurs devaient choisir "bon", "moyen" ou "insuffisant". L'accord entre les réponses des trois enquêteurs a été mesuré par le test Kappa (Cohen 1960) : selon les réponses, la valeur du coefficient Kappa a varié de 0,49 à 0,59 ce qui caractérise un accord modéré entre enquêteurs selon l'échelle de Landis et Koch (Landis & Koch 1977). On a donc considéré pour chacun des critères la médiane des trois réponses pour chacun des critères appréciés. La répartition des 24 élevages apicoles classés selon ces critères est indiqué au tableau 5.

Concernant les résidus de pesticides, de nombreux tests statistiques explorant l'influence de leur présence sur le niveau des populations d'abeilles ont été effectués. Seuls ceux qui étaient statistiquement pertinents par rapport à la santé des colonies ont été pris en compte et rapportés dans ce rapport. Onze molécules sur les 41 recherchées ont été retenues dans l'analyse statistique. Des variables de synthèse ont été créées en rassemblant les résultats concernant l'imidaclopride et son

métabolite, et le fipronil et ses métabolites. De plus, une variable de synthèse « fongicide » a également été créée en additionnant les résultats relatifs aux résidus de penconazole, procymidone, propiconazole, tebuconazole, tetraconazole et vinclozoline.

- Traitement des données

1. L'analyse statistique relative à l'influence potentielle des pathologies sur les populations d'abeille et de couvains est tout d'abord réalisée.

Les niveaux des populations des adultes et du couvain sont corrélés (Spearman $\rho = 0.56$, $p < 0.001$) comme on pouvait s'y attendre. On a procédé à une analyse en composante principale et la première composante qui rassemble 81% de la variance totale a été utilisée comme variable composite à expliquer. Lors de l'étape univariée de sélection des variables, le degré de significativité des relations deux à deux entre cette variable et les variables explicatives a été évalué par le test de χ^2 . Des modèles linéaires mixtes selon la méthode décrite par Laird & Ware ont été utilisés pour expliquer l'évolution des niveaux de population (Laird & Ware 1982). On a tenu compte du fait que le plan expérimental correspond à un modèle de type emboîté : chaque colonie est incluse dans un rucher (considéré comme une variable à effet aléatoire). On a aussi tenu compte des variations saisonnières attendues de la population en considérant cette variable en tant que variable d'ajustement considérée comme effet fixe dans les modèles. On a également tenu compte de l'inégalité de la variance entre saisons.

Une première étape a consisté à intégrer une à une les variables explicatives dans le modèle (maladies, agents pathogènes et critères de conduite du rucher). On a testé l'interaction entre maladie (ou agent pathogène) et le facteur saison. Les variables qui ont pu être sélectionnées lors de cette première étape (significativité du lien avec la variable à expliquer inférieure à 0.25) ont été sélectionnées par un modèle multivarié selon un procédé de sélection descendante (significativité du lien avec la variable à expliquer inférieure à 0.05).

2. L'analyse statistique relative à l'influence potentielle des résidus sur les populations d'abeille et de couvain est ensuite réalisée. Les résultats concernant la détection de chaque résidu de pesticides dans chaque matrice ont été examinés, en portant une attention particulière à leur dispersion. Lors d'une seconde étape, les relations entre les substances actives, indépendamment des matrices d'une part et les corrélations entre la présence d'un composé donné dans différentes matrices d'autre part ont été étudiées en utilisant des tests de χ^2 . Ces tests ont également été utilisés pour étudier les corrélations entre la présence de résidus de pesticides et les pathologies. Les modèles linéaires mixtes utilisés étaient les mêmes que ceux décrits plus haut.

Les modèles linéaires mixtes utilisés pour expliquer les variations de population en fonction de la présence de résidus étaient similaires à ceux décrits plus haut, l'unique différence étant la prise en compte du seul facteur rucher en effet aléatoire. Dans un premier temps, chaque variable explicative (la présence d'un résidu de pesticide) a été ajoutée individuellement au modèle. L'interaction avec la saison a été examinée pour chaque variable. Dans un deuxième temps, les variables qui avaient un lien statistique avec les résultats ont été introduites dans un modèle multivarié selon un procédé de sélection descendante.

Des modèles de régression logistique conditionnelle, tenant compte de l'effet rucher, ont été utilisés pour expliquer la mortalité en fonction de la présence de résidus de pesticides. Comme pour les modèles mixtes précédents, une première étape de sélection des variables explicatives par des modèles univariés a été réalisée.

Tous les calculs statistiques ont été exécutés à l'aide du logiciel statistique "R" version 2.5.0 (R Development Core Team 2007). Les modèles linéaires mixtes ont été ajustés à l'aide de la librairie "nlme" (Pinheiro & Bates 2000). Les régressions logistiques conditionnelles ont été réalisées en utilisant la librairie "survival".

2. RESULTATS

2.1. Niveaux de population

Dans l'ensemble, la population des adultes a suivi l'évolution saisonnière classiquement décrite (Figure 1a). A la fin de l'hiver (visite A), le niveau moyen de la population adulte était au plus bas, égal à 5,8 ; 5,1 puis 5,2 inter-cadres occupés de 2003 à 2005. Ensuite, la population a augmenté atteignant des niveaux de 10,7 ; 7,9 et 12,6 inter-cadres à la visite B des mêmes années. Les niveaux se sont ensuite abaissés à 9,0 et 10,1 au cours des étés 2003 et 2005 (visite C) alors que le niveau a continué à augmenter au cours de l'été 2004, atteignant 9,7 inter-cadres occupés. Les niveaux de population ont tous baissé à l'automne (visite D) avec les valeurs suivantes 6,5; 6,0 et 6,2 successivement de 2003 à 2005. Au début de l'étude, à l'automne 2002, ce niveau, comparable, était égal à 6,7.

Le niveau moyen de la population de couvain s'est accru à partir du minimum de l'automne (visite D: moyennes de 1,0; 2,4; 1,9 et 2,7 cadres de 2002 à 2005) pour atteindre un maximum au printemps (visite B: moyenne de 6,2; 4,9 et 7,4 cadres pour les années 2003 à 2005) (Figure 1b).

2.2. Maladies et agents pathogènes

- Présence de maladies ou d'agents pathogènes

La prévalence de mycose et de spores de *Nosema sp.* a été élevée au cours des trois années du suivi que l'on considère les niveaux rucher ou colonies (Tableau 6). Selon la saison, on a pu observer les caractéristiques d'une forte infestation par *Varroa destructor* dans une proportion des ruchers variant du tiers à la moitié. Ramené au niveau colonies, la fréquence d'un niveau élevé d'infestation a oscillé entre 14,8% en 2004 et 23,9% en 2005. Les loques (américaine et européenne) ont été les maladies les plus prévalentes dans les ruchers oscillant entre 31,8% en 2005 et 39,1% en 2004. La présence dans les ruchers de spores de *Nosema sp.* Identifiés dans les abeilles vivantes est représentée Figure 2. Minimale avant l'hiver (9,1; 20,8; 12,5 et 9,1 % des ruchers de 2002 à 2005), cette prévalence a systématiquement augmenté pendant l'hiver atteignant son maximum au printemps (visite B: 68,0; 66,0 et 41,7 % des ruchers infestés de 2003 à 2005). Au cours des trois années, aucun rucher n'a été trouvé exempt de spores de *Nosema sp.*

Alors que l'on a recherché *A. woodi* sur tous les échantillons d'adultes récoltés au cours des cinq premières visites (de la visite D 2002 à la visite D 2003 incluse) un seul échantillon s'est révélé positif dans le département du Gard au cours d'une visite de printemps 2003. Ce diagnostic représente un cas résiduel de la flambée d'acariose des trachées survenue dans cette région en 2002. Compte tenu de la négativité des prélèvements suivants, et surtout de l'absence de tout signe clinique évoquant cette parasitose, il a été décidé de ne plus rechercher *A. woodi* à partir du printemps 2004 dans un souci d'économie de temps.

L'étude des corrélations entre maladies a mis en évidence l'association des deux loques ($P < 0,001$, odd ratio (OR) = 14,8 [5,6-36,4]). Le cannibalisme est associé à la varroase ($P < 0,05$, OR = 2,82 [1,56-4,90]) et à la loque européenne ($P = 0,08$ OR = 2,33 [0,68-6,34]) mais pas à la loque américaine ($P = 0,99$ OR = 0,97 [0,25-2,71]). Le couvain en mosaïque est un symptôme significativement associé à la plupart des maladies du couvain étudiées ($P < 0,05$): la loque américaine (OR = 5,6 [3,0-10,4]), la loque européenne (OR = 5,9 [2,6-13,2]) la varroase (OR = 2,1 [1,2-3,5]), la mycose (OR = 5,0 [3,6-7,0]) à l'exception du couvain chauve.

- Le traitement contre la varroase et la conduite des ruchers

De tous les traitements d'automne, ce fut Apivar© qui a été le plus fréquemment utilisé (Tableau 7). Cependant, on peut remarquer que beaucoup d'apiculteurs n'ont pas traité leurs ruches au cours de l'automne (de 4,2 à 20,8% d'entre eux à l'automne 2002 et 2003). Les traitements d'automne utilisant l'acide oxalique, l'acide formique, le thymol ou des préparations "maison" pris dans leur ensemble ont représenté une fréquence de 20%, constante d'année en année.

Les traitements de printemps sont moins fréquents (de 33,3 à 66,7% des ruchers n'ont pas été traités au printemps). En effet d'une part ces traitements ne sont pas toujours nécessaires, d'autre part ils ne

sont pas toujours possibles à cause des contraintes de production de miel: les lanières d'Apivar© utilisées au printemps ne peuvent pas toujours être laissées dans les ruches pendant les 10 semaines quand cette période chevauche la miellée.

L'analyse des critères de conduite des ruchers concernant le traitement contre la varroase révèle une relation statistiquement significative avec cette parasitose. En effet, lorsque ce critère a été considéré comme "moyen" par les enquêteurs, l'incidence de la varroase a été de 7,9%, alors que cette incidence n'a été que de 4,9% quand ce critère a été évalué comme "bon"³. Cette différence bien que faible est statistiquement significative (test du Chi², p = 0,026).

- Maladies et agents pathogènes versus population : modélisation

Après la première étape d'analyse en modèles mixtes, la varroase, la loque européenne, la mycose, le couvain chauve et la gestion générale des ruchers ont été retenus pour la modélisation multivariée. En effet, compte tenu de la très forte co-linéarité entre les valeurs attribuées aux différents critères d'appréciation de la conduite des ruchers, seule la valeur attribuée au critère (4) (gestion générale du rucher) a été introduite dans le modèle. Après l'étape de sélection descendante seule la mycose et la conduite du rucher ont été retenus dans le modèle final. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Le paramètre gestion générale du rucher a donc été identifié comme étant celui qui est le plus fortement lié au niveau des populations. Les valeurs "moyen" ou "insuffisant" de ce critère se révèlent avoir eu un effet dépresseur significatif sur la population, par comparaison aux ruchers notés "bon" pour ce critère. La présence de mycose est positivement associée à une augmentation de la population – ce résultat n'est paradoxal qu'au premier abord : il doit en effet être mis en perspective avec le fait que le développement de cette maladie est en rapport avec le développement du couvain.

- Maladies et agents pathogènes versus mortalité

Au total 56 colonies sont mortes au cours du suivi (Tableau 4). La mortalité hivernale a oscillé entre 5,8% en 2005 et 9,2% en 2004 (7,3% en 2003). La mortalité en saison entre 6,7% en 2003 et 10,8% en 2004 (7,6% en 2005).

Nous nous sommes intéressés au pronostic après diagnostic des maladies : le diagnostic de la loque européenne dans une colonie a été suivi dans 26,7% des cas (8/30) par la mort de cette même colonie constatée au cours de l'une des trois visites suivantes. Pour la loque américaine, ce pronostic reste sévère puisque 22,9% des diagnostics (11/48) sont suivis par la mort de la colonie, de même que pour la forte infestation par le Varroa : 18,6% (16/86). La liaison entre le diagnostic de ces maladies et la mort des colonies est différente dans sa durée suivant la maladie considérée. Une mortalité rapide (constatée à la visite_{i+1}) a été corrélée de manière significative avec le diagnostic de loques posé dans cette colonie lors de la visite_i (loque américaine : p<0,001, OR = 5,4 [2,1-12,5], loque européenne p<0,001, OR = 6,7 [2,1-17,8]). En revanche, aucune corrélation statistiquement significative n'est observée entre loques et mortalité lors des visites de rang 2 ou 3 après la visite lors de laquelle ce diagnostic avait été établi (visite_{i+2}, et visite_{i+3}) (loque américaine p=0,59, OR = 1,33 [0,34-3,81]; européenne p=0,90, OR = 1,09 [0,12-4,49]). Concernant la varroase, la corrélation entre mortalité et diagnostic d'une forte infestation est significative aussi mais suit un autre schéma : elle a été significative pour la mortalité enregistrée lors des visites de rang 2 et 3 (visite_{i+2}, et visite_{i+3}) (P<0,05, OR = 2,6 [1,2-5,2]) mais non pas lors de la première visite suivant le diagnostic de varroase (visite_{i+1}) (P=0,70, OR = 1,22 [0,31-3,45]).

2.3. Résidus de pesticides et fongicides

- Distribution des résidus de pesticides dans les matrices apicoles

Lorsqu'au cours d'une visite donnée pour un rucher donné (visite x rucher), un résidu donné a été trouvé dans une matrice apicole au moins (abeilles, pollen, miel, cire), cette visite a été considérée

³ Aucun rucher n'a été classé "insuffisant" pour ce critère.

comme positive pour ce résidu. Le nombre de résidus différents trouvés lors d'une visite dans un rucher (quelles que soient les matrices contaminées) a varié de 0 à 9 (Figure 3). Le pourcentage de visites x ruchers sans résidu a été de 12,7%. Le cas le plus fréquent a été 2 résidus trouvés (29,6%) et le plus rare fut 9 résidus trouvés (8 résidus dans la cire et une seule visite x rucher). Si l'on exclue le coumaphos de cette statistique (pour ne considérer que les pesticides d'origine agricole⁴), le pourcentage de visites x ruchers sans résidu est alors de 16,6%.

Dans la liste des composés recherchés, les résidus du groupe imidaclopride – acide 6-chloronicotinique ont été les plus fréquemment trouvés dans les échantillons de pelotes de pollen, de miel et d'abeilles (Tableau 9). Dans les pelotes de pollen, les concentrations trouvées ont dépassé la limite de détection respectivement dans 40% (75/185) et 32% (61/185) des prélèvements pour ces deux composés – et dans 16% (30/185) des prélèvements quand ces deux composés étaient simultanément présents. Les concentrations les plus élevées ont été respectivement de 5,7 µg/kg et 9,3 µg/kg pour ces deux composés. Toujours dans les pelotes de pollen, les fongicides et le carbaryl viennent en second et troisième rang de fréquence avec respectivement 16,0 et 13,5%. Dans les échantillons de cire, le tau-fluvalinate et le coumaphos sont les deux résidus les plus fréquents. Dans les échantillons de miel, les résidus sont moins fréquents mais le coumaphos et l'imidaclopride sont deux exceptions notables puisqu'ils ont été trouvés dans 8,5 et 29,7% des échantillons.

Les résidus de fipronil, fipronil sulfone ou fipronil désulfinyl ont été mis en évidence à une concentration supérieure à la limite de détection respectivement dans 11, 12 et 6 échantillons de pollen. Les valeurs maximales trouvées dans les pelotes de pollen, pour les dérivés sulfone et désulfinyl du fipronil ont été de 3,6 µg/kg et 1,5 µg/kg.

Les matrices cire et pollen sont les matrices les plus contaminées en nombre de résidus présents.

- Détection simultanée de différents résidus dans les matrices

La présence simultanée dans les abeilles et les pelotes de pollen (même visite x rucher) de certaines substances est apparue significativement corrélée (Tableau 10). Des résidus d'imidaclopride ou de son métabolite ont été associés à la présence de 5 autres substances : deux fongicides (epoxyconazole et tebuconazole), le tau-fluvalinate, la deltaméthrine et le groupe fipronil (substance active et métabolites). Cependant ce résultat statistique ne repose que sur un très petit nombre d'observations. Aucune liaison entre contamination de la cire et du miel par les mêmes substances ne s'est révélée statistiquement significative.

On a aussi recherché s'il existait des associations significatives de la contamination de deux matrices différentes par les mêmes substances actives dans le même rucher lors de la même visite (Tableau 11). Ceci se vérifie pour le groupe fipronil : on trouve de manière significative plus fréquemment des résidus simultanément dans le pollen et dans les abeilles ($p = 0,02$).

La même tendance se dessine aussi concernant la présence de résidus du groupe imidaclopride d'une part dans le couple abeille – pollen, d'autre part dans le couple miel – pollen, mais c'est une tendance seulement dans la mesure où les seuils de signification sont compris entre 0,05 et 0,15.

- Etude des liens entre la présence des résidus de pesticides et les niveaux de populations d'abeilles et la mortalité

Dans un premier temps, l'influence de chaque résidu a été statistiquement étudiée séparément sur chaque variable et dans chacune des conditions (ruchers, matrices). Etant donné le faible nombre de présences de résidus observées dans les différentes matrices, il était difficile de pouvoir mettre en évidence un effet significatif des résidus de pesticides sur les niveaux de population adultes et larvaires lorsqu'on considère ces matrices séparément. Pour améliorer la puissance des tests statistiques pratiqués, il a donc été choisi d'additionner les résultats provenant de toutes les matrices pour chaque molécule. Cependant aucun modèle mixte n'a trouvé de corrélation statistiquement significative entre la présence de résidus de pesticides et les variations de population.

⁴ Le tau-fluvalinate retrouvé dans les ruchers peut être d'origine apicole ou agricole.

Après la première étape de sélection univariée, seules les présences de résidus d'endosulfan et de coumaphos pouvaient être potentiellement corrélées avec les mortalités enregistrées, ce qui leur a permis d'être sélectionnés pour continuer l'analyse statistique. Cependant la confusion avec un effet saisonnier était possible pour les résultats de ces deux molécules. Il est à noter que des résidus de ces deux pesticides ont été trouvés la plupart du temps dans les échantillons prélevés à la visite d'automne (par exemple, pour le coumaphos, 53 observations sur 78 au total). Ceci peut être lié avec les pertes de colonies qui ont été la plupart du temps enregistrées après la visite automnale (27 observations sur 56 au total). Sur 20 observations de la mortalité de colonie avec la présence des résidus de coumaphos, 15 se sont déroulées après la dernière visite de l'année. De même, 7 cas de mortalité hivernale de colonie ont été enregistrés en même temps que des résidus d'endosulfan sur un total de 10 observations. Une variable binaire a donc été introduite dans le modèle pour tenir compte de l'effet saison sur la mortalité. Les résultats de ce modèle (Tableau 12) ont montré une différence significative entre la saison et les mortalités hivernales, mais aucun effet significatif des résidus de coumaphos et d'endosulfan sur la mortalité.

3. DISCUSSION

3.1. Méthodologie : plan d'expérience et interprétation

Cette étude avait pour but de suivre des ruchers avant que tout événement grave (une forte chute de population) ne se produise. Ainsi les causes premières ou les causes favorisantes de ces problèmes auraient pu être observables : contamination par des produits toxiques ou maladies graves. Afin de dégager les facteurs les plus déterminants, il importait d'inclure plusieurs régions et plusieurs ruchers par région comme le recommandent plusieurs auteurs (Delaplane & Hood 1999, Fries *et al.* 2006). Nous avons aussi pris soin d'inclure plusieurs types d'apicultures (professionnelle et de loisir). Bien entendu, le nombre de sites et de colonies incluses dans l'étude sont un pré requis pour assurer la représentativité de toute étude de terrain (Delaplane & Hood 1999, Delaplane *et al.* 2005, DeGuzman *et al.* 2005, Currie & Gatien 2006). Le nombre de ruchers et de colonies inclus dans cette étude a été un compromis entre "l'optimum biostatistique" et les moyens financiers et humains qu'il était possible de consacrer à une enquête longue, nécessitant des interventions répétées, des localisations nombreuses et éparpillées, et des analyses physico-chimiques extrêmement coûteuses. De manière idéale, les scénarios les plus faciles à interpréter eussent été l'observation de mortalités massives, combinées au recueil de nombreuses données avant et après de tels événements. Or, nous n'avons pas observé de mortalités massives telles que celles décrites par plusieurs apiculteurs et mentionnées entre autres auteurs par Laruent & Rathahao (Laurent & Rathahao 2003). La grande variabilité de la réponse des colonies à des infections ou infestations, et à des intoxications est un fait connu qui complique l'interprétation : ceci a par exemple été décrit lors d'infestation expérimentale par l'agent de la mycose (Koenig *et al.* 1987), lors d'études concernant la survie à l'infestation par varroa (Szabo & Szabo 2003), ainsi que des études portant sur l'immuno-compétence et la survie hivernale des colonies après exposition à des pesticides (Erickson *et al.* 1994). Néanmoins, les populations suivies dans notre étude ont montré des variations dont l'interprétation a été rendue possible par la mise en oeuvre d'une méthodologie statistique appropriée prenant en particulier en compte le plan d'expérience emboîté des colonies suivies, les variations saisonnières, la forte co-linéarité entre variables et la variabilité des réponses.

3.2. Mortalités

Les mortalités (mortalités hivernales ou mortalités en cours d'année apicole) restent dans les limites acceptables.

Des impératifs liés aux visites (visites réalisées avec de mauvaises conditions météorologiques, visites de ruche dont la présence d'une ou plusieurs hausses de miel obligeait à démonter complètement la colonie pour accéder au corps du bas) ou des problèmes techniques apicoles (présence de trappes à pollen en activité empêchant la fécondation des reines) ont pu avoir une

influence néfaste sur les colonies. En effet, sur les 39 cas de mortalité dans lesquels aucune maladie sévère n'avait été identifiée au par avant, 23 cas étaient des colonies bourdonneuses ou orphelines.

3.3. Maladies et agents pathogènes

Cette étude confirme que l'incidence de l'acariose des trachées reste à un niveau très faible sur l'ensemble du territoire ce qui justifie la perte de son statut de "maladie réputée contagieuse" dans notre pays (Direction Générale de l'Alimentation 2006). Parmi les six autres maladies, anomalies ou agents pathogènes suivis, trois sont en relation avec une mortalité faible : la mycose, le couvain chauve et l'infestation par *Nosema sp.* La mycose tue rarement les colonies mais elle entraîne une perte de couvain. Ses causes favorisantes sont les températures extrêmes (chaudes ou froides), les abeilles "noires" qui sont plus réceptives, des co-infections (acariose et paralysie), une carence en pollen ou du pollen de qualité médiocre, une conduite apicole trop intensive (Gilliam 1978, Heath 1982, Flores *et al.* 2005). *A. apis* est donc un pathogène opportuniste (Heath 1982).

Comme son nom l'indique, le couvain chauve correspond à l'absence d'operculation des cellules du couvain : la tête de la nymphe reste visible. L'infestation par *Achroia grisella* qui en est responsable est maintenue à un niveau peu élevé quand la colonie est forte (Root 1990). Cette anomalie est en augmentation notable ces dernières années sans qu'il soit possible de donner une cause explicative certaine.

La fréquence de la présence de spores de *Nosema sp.* a suivi une dynamique saisonnière classique (Figure 2) avec une croissance rapide au printemps suivie par des niveaux plus bas en été (Fries 1993). Nous avons identifié les deux espèces *Nosema apis* et *N. ceranae* dans plusieurs ruchers de cette étude (Chauzat *et al.* 2007) mais nous n'avons pas observé de symptômes de nosérose caractérisant la maladie installée (abeilles traînantes, abeilles mortes avec ou sans diarrhées). Concernant la nosérose, il est important de prendre en compte les deux formes possible de cette pathologie : la forme maladie et la forme latente qui sévit au cours de l'hiver (sans symptômes apparents). Cette forme a été mise en évidence dans l'enquête par la présence de spores de *Nosema sp.* durant la période hivernale et doit être identifiée comme un facteur d'affaiblissement possible, couplé à d'autres parasites prédateurs de protéines (*V. destructor*). Le rôle pathogène de *Nosema sp.* doit aussi être considéré vis-à-vis des reines (Hassanein 1951). Bien que non recherché dans les reines pour des raisons de pérennité des colonies, le rôle de ce parasite n'est pas à exclure sur leur physiologie compte tenu de sa présence dans les colonies.

Dans cette étude, on a observé une forte corrélation entre cannibalisme et varroase et entre cannibalisme et loque européenne. Le cannibalisme exercé sur la descendance est un procédé fréquent de limitation des populations d'insectes soumises à un stress (Thomas & Manica 2003). Le cannibalisme exercé sur les larves n'est pas exceptionnel chez l'abeille (Schmickl & Crailsheim 2002). Il contribue à recycler les protéines investies dans le couvain au bénéfice des adultes survivants (Webster & Peng 1987, Schmickl & Crailsheim 2001). Ce comportement peut être une réponse adaptative à une forte infestation par *V. destructor*. L'action spoliatrice de ce parasite entraîne en effet chez les nourrices une diminution du taux de protéines de l'hémolymphe, ce que les nourrices corrigent en consommant les nymphes (Faucon 1992).

V. destructor entraîne des pertes de colonies après les miellées en fin d'automne ou en hiver (Delaplane & Hood 1997, Delaplane & Hood 1999). Le déficit du taux de protéines dans l'hémolymphe des pupes ou des abeilles adultes parasitées explique leur incapacité à développer les caractères physiologiques clés qui assurent la longévité des abeilles d'hiver – celles-ci ne peuvent donc survivre jusqu'au printemps suivant. L'impact de *V. destructor* sur les colonies étant différé de plusieurs mois, il n'en est que plus insidieux. Cette étude le démontre une fois de plus. Le problème des traitements de *V. destructor* doit être soulevé. Dans certains cas, l'enquête a montré que le traitement n'était pas réalisé ou réalisé avec des molécules acaricides n'assurant pas une élimination suffisamment correcte des parasites.

Enfin il est important de garder à l'esprit que l'incidence des agents pathogènes sur le développement des colonies ou sur leur mortalité au cours de cette enquête a été modifié par les actions correctives conseillées aux apiculteurs lors des épisodes de maladies.

3.4. Les résidus de pesticides

L'imidaclopride et son métabolite l'acide 6-chloronicotinique ont été les molécules le plus souvent trouvées dans des abeilles, le miel et les pelotes de pollen. L'imidaclopride a une demi-vie dans l'abeille de 4,5 heures et est à l'origine de deux principaux métabolites l'acide 6-chloronicotinique et le dérivé urée (Suchail *et al.* 2004). La métabolisation d'autres insecticides néocotinoïdes tels que l'acetamipride aboutit aussi à l'acide 6-chloronicotinique (Brunet *et al.* 2005). Ceci suggère que l'abeille ne serait pas exposée seulement à l'imidaclopride mais également à d'autres insecticides tels que l'acétamipride. La toxicité de l'imidaclopride et de ses métabolites vis-à-vis des abeilles a été longuement discutée (Faucon *et al.* 2005, Maxim & van der Sluijs 2007).

Le synergisme entre les insecticides néocotinoïdes et certains fongicides (époxyconazole et propiconazole, appelés aussi fongicides DMI) a été étudié. Lors d'expérimentations en laboratoire, la toxicité de l'acetamipride ou du thiaclopride vis-à-vis des abeilles a été augmentée lorsque ces molécules sont appliquées après un traitement préparatoire avec des fongicides DMI (rapport synergique de 559 quand le propiconazole a été ajouté). En revanche dans les mêmes conditions le rapport synergique pour l'imidaclopride était très inférieur (1,52). De même des phénomènes de synergie peuvent se développer avec des agents pathogènes comme c'est le cas chez une blatte (Dyctyoptera : Blattoptera) qui, nourrie avec de l'imidaclopride, devient plus sensible au développement du champignon *Metarhizium* (Kaakeh *et al.* 1997). Cependant, lors d'expérimentations menées en plein champ, la toxicité de certaines de ces associations étaient inférieures aux résultats de laboratoire (Iwasa *et al.* 2004). Les résultats de ce travail soulèvent donc le problème de (1) la présence de divers résidus en même temps dans la ruche, (2) la présence concomitante d'agents pathogènes microbiens dans des abeilles (3) le manque de données permettant de valider en conditions naturelles les scénarios décrits plus haut.

Le fipronil, est un insecticide « nouvelle génération » du fait de son mode d'action différent des organophosphorés, des carbamates et de certains pyréthriinoïdes (Gunasekara *et al.* 2007). Cet insecticide est employé pour le traitement des insectes du sol, des insectes foliaires et également contre les tiques animales (Le Faouder *et al.* 2007). Le fipronil est fortement toxique pour les organismes non cibles présents dans l'environnement tel que la faune aquatique, le gibier à plumes et les abeilles (Le Faouder *et al.* 2007). Dans le tournesol, le transfert du fipronil par le xylème à partir des graines enrobées vers les parties aériennes a été démontré à un niveau très bas ce qui est cohérent avec les propriétés basses de systémie de la molécule (coefficient de partage octanol/eau $K_{ow} = 3.5$) (Aajoud *et al.* 2006). Dans notre étude, on a montré que le miel, les pelotes de pollen et les abeilles ont été contaminés par le fipronil ou un de ses métabolites à des concentrations très basses. Les teneurs moyennes dans le pollen étaient toutes inférieures à $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Ces teneurs sont très en deçà des valeurs de toxicité aiguë du fipronil. La DL_{50} du fipronil est de 4 - 6 ng/abeille, ce qui correspond à 40 - 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ si on considère le poids moyen d'une abeille égal à 100 mg (Roper 2002).

Le coumaphos est un acaricide utilisé pour le traitement de la varroase. Il a été fréquemment trouvé dans les matrices apicoles à l'exception de l'Eure et de l'Yonne. Le médicament vétérinaire officiel à base de coumaphos (Perizin®) n'était pas disponible en France lors de cette enquête. Des préparations « maison » ont été réalisées à partir de l'Asuntol®, médicament utilisé pour les traitements des chiens. Nous avons observé que les préparations ont été appliquées dans les ruches souvent à des doses plus élevées que les doses recommandées. Cette pratique d'automédication doit être mise en parallèle avec les résidus de coumaphos souvent détectés dans des échantillons de cire. La contamination des cires est à rapprocher du problème des reines déjà mentionné. Une partie des mortalités de colonies peut trouver là une explication. La reine, à l'inverse des autres castes d'abeilles, subit au cours de sa vie (2-3 ans) plusieurs applications de produits de toxicité variable à l'occasion des traitements de la varroase (amitraze, fluvalinate, coumaphos, thymol). De plus, les reines vivent sur des cires contaminées par les molécules issues du traitement de la varroase (coumaphos, fluvalinate) et issues du traitement des plantes (azinphos-méthyl, cyfluthrine,

vinclozoline). Ces conditions sont de nature à expliquer leur moindre vitalité ou leur remplacement précoce naturel (supersédure) ou par les apiculteurs.

CONCLUSIONS

Cette étude a été conduite pendant trois ans (de 2002 à 2005) sur 120 colonies maintenues en conditions naturelles en France. Lors des quatre visites effectuées tous les ans, des examens cliniques des colonies et des recherches d'agents pathogènes ont été menées systématiquement sur chacune des colonies. Des prélèvements de différentes matrices (abeilles vivantes, miel, cire et pelotes de pollen) ont été réalisés afin de rechercher les résidus d'une quarantaine de pesticides. Parallèlement, les apiculteurs participant à cette étude ont été interrogés sur leurs pratiques apicoles.

Les principales conclusions mettent en évidence :

- l'absence d'effondrements de la population des colonies tels que décrits par les apiculteurs lors de l'exploitation de certaines miellées au cours de notre étude (pas de disparition soudaine et importante des abeilles).
- des mortalités hivernales ou des mortalités durant la saison apicole situées dans l'intervalle considéré comme non exceptionnelles en apiculture.
- la présence de maladies ou d'agents pathogènes expliquant pour partie les mortalités constatées.
- des anomalies (qualifiées de problème de reine) pouvant expliquer les autres mortalités de colonies. L'origine de ces anomalies peut être attachée à des maladies propres à la reine (nosémose), à l'exposition à des résidus de pesticides à travers les matrices apicoles, à la toxicité des traitements vétérinaires.
- la présence dans l'ensemble des matrices apicoles de résidus de pesticides à des doses très faibles. Les résidus les plus importants, en fréquence de présence, étaient l'imidaclopride (apport exogène) et le coumaphos (apport endogène dû au traitement de la varroase). La présence des résidus d'imidaclopride dans les matrices apicoles n'a pas entraîné de mortalité aiguë de colonies ou d'abeilles comme cela avait déjà été démontré en 2005 lors d'une expérimentation de nourrissage de colonies d'abeilles avec du sirop contaminé (Faucon *et al.* 2005).
- les synergies possibles entre les divers résidus de pesticides d'une part, entre les résidus de pesticides et les agents pathogènes d'autre part.
- l'absence de traitement de la varroase ou l'utilisation de produits de traitement insuffisamment efficaces dans certains cas.

Le protocole de l'enquête n'était pas destiné à mettre en évidence des affaiblissements de colonies de faibles intensité.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les apiculteurs qui ont participé à cette étude, pour leur accueil dans leurs ruchers et leur temps offert. L'assistance des services vétérinaires des départements visités a été déterminante. Cette étude a été en partie financée par la Communauté Européenne au travers de projets FEOGA.

Tableau 1 : Liste des insecticides, acaricides et fongicides recherchés.

Insecticides					Fongicides	
Pyréthriinoïdes	Organochlorés	Organophosphorés	Carbamates	Autres	Triazoles	Dicarboximides
Cyfluthrine	Endosulfan	Azinphos-méthyl	Aldicarbe	Imidaclopride	Cyproconazole	Procymidone
Cyperméthrine	Lindane	Chlorpyrifos	Aldicarbe sulfoxyde	(<i>Néocotinoïde</i>)	Epoxyconazole	Vinclozoline
Deltaméthrine		Coumaphos	Aldicarbe sulfone	Fipronil	Fluzilazole	
Lambda-cyhalothrine		Diméthoate	Mercaptodiméthur	(<i>Phénylpyrazole</i>)	Hexaconazole	
Tau-fluvalinate		Fénitrothion	Mercaptodiméthur sulfone		Myclobutanil	
		Fenthion	Mercaptodiméthur sulfoxyde		Penconazole	
		Malathion	Carbaryl		Propiconazole	
		Méthidathion	Carbofuran		Tébuconazole	
		Mévinphos	Méthomyl		Tétraconazole	
		Parathion	Oxamyl			
		Parathion-méthyl				

Tableau 2 : Méthodes analytiques mises en oeuvre pour les matrices miel, pollen, abeilles et cires, en fonction des familles des pesticides recherchées.

Matrices	Méthodes analytiques	Familles de pesticides
Miel	LC/MS/MS	Néocotinoïdes et phénylpyrazoles Carbamates, triazoles
	GC/MS/MS	Pyréthroïdes, organochlorés, organophosphorés, procymidone et vinclozoline
Pollen	LC/MS/MS	Néocotinoïdes et phénylpyrazoles Carbamates et triazoles
	GC/ECD et GC/NPD	Pyréthroïdes, organochlorés et organophosphorés
Abeilles	LC/MS/MS	Néocotinoïdes et phénylpyrazoles Carbamates et triazoles
	GC/ECD et GC/NPD	Pyréthroïdes, organochlorés et organophosphorés
Cire	GC/MS/MS	Pyréthroïdes, organochlorés, organophosphorés, procymidone et vinclozoline

LC/MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

GC/MS/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem

ECD : Détecteur à capture d'électrons

NPD : Détecteur thermo-ionique

Tableau 3 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des insecticides organophosphorés, organochlorés et pyréthrinoïdes de synthèse.

Analyte	Abeilles				Pollen	
	LOD (µg/kg)	LOD (ng/abeille)	LOQ (µg/kg)	LOQ (ng/abeille)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Azinphos-méthyl	57,0	5,7	196,1	19,6	57,0	196,7
Chlorpyrifos	10,0	1,0	34,5	3,5	10,0	34,5
Coumaphos	37,0	3,7	142,8	14,3	37,0	142,6
Cyfluthrine	7,0	0,7	39,5	4,0	7,0	98,7
Cyperméthrine	3,8	0,38	32,7	3,3	3,8	93,3
Deltaméthrine	0,1	0,01	24,9	2,5	0,1	29,9
Diméthoate	18,0	1,8	59,6	6,0	18,0	59,6
Endosulfan	0,1	0,01	8,0	0,80	0,1	8,0
Fénitrothion	19,0	1,9	66,9	6,7	19,0	66,9
Fenthion	8,0	0,8	30,6	3,1	8,0	30,6
λ-cyhalothrine	0,4	0,04	12,9	1,3	-	-
Lindane	0,1	0,01	1,5	0,15	0,1	4,0
Malathion	9,0	0,9	31,5	3,2	9,0	31,5
Méthidathion	13,0	1,3	49,6	5,0	13,0	49,6
Mévinphos	3,8	0,38	18,5	1,9	3,8	27,7
Parathion-éthyl	8,0	0,8	30,4	3,0	8,0	30,4
Parathion-méthyl	10,0	1,0	39,5	4,0	10,0	39,5
Tau-fluvalinate	1,1	0,11	11,4	1,1	1,1	76,0

Tableau 4 : Définition et distribution des variables explicatives utilisées dans l'analyse des niveaux de populations d'abeilles adultes, de couvain et la mortalité des colonies.

Groupes de variables	Définition des variables	Description
Variables expliquées	Population adulte	Moyenne = 7.8 écart-type = 4.0 valeurs extrêmes = [1 – 30]
	Couvain	Moyenne = 3.9 écart-type = 2.6 valeurs extrêmes = [0 – 19]
	Mort de la colonie	56 colonies/1425 colonies × visites
Variables explicatives	Loque américaine	51 (3.3%)
	Loque européenne	30 (1.9%)
	Mycose*	378 (24.6%)
	Couvain chauve	316 (20.6%)
	Forte infestation par Varroa	104 (6.8%)
	Spores de <i>Nosema sp.</i>	193 (12.6%)

* Mycose à *Ascosphaeras apis*

Tableau 5 : Répartition des caractéristiques de la conduite des 24 ruchers selon 5 critères et évaluation de l'accord entre les 3 enquêteurs ayant évalué ces caractéristiques (coefficient Kappa).

* Mycose à *Ascosphaera apis*

Conduite du rucher	N	%	Kappa
(1) Aptitude à identifier les symptômes des maladies et l'attention portée à celles-ci :			
Bonnes	6	25	0,59
Moyennes	10	42	
Insuffisantes	8	33	
(2) Traitement contre la varroase :			
Bon	9	37,5	0,49
Moyen	15	62,5	
(3) Démarche suivie en cas de mycose* ou de loques :			
Bonne	9	37,5	0,53
Moyenne	9	37,5	
Insuffisante	6	25	
(4) Gestion générale du rucher :			
Bon	8	33	0,57
Moyen	10	42	
Insuffisant	6	25	
(5) Organisation générale du rucher :			
Bonne	11	46	0,50
Moyenne	8	33	
Insuffisante	5	21	

Tableau 6 : Nombre (pourcentages entre parenthèses) de diagnostics positifs de maladies (ou d'agents pathogènes) dans les ruchers ou les colonies au cours des années 2002 à 2005. Le nombre de rucher a été constant et égal à 24. Selon le nombre de colonies mortes et remplacées, le nombre de colonies suivies au total au cours de l'année a oscillé entre 120 et 136 (voir le paragraphe "Matériel et méthodes"). Les données de l'année 2002 concernent la seule visite effectuée cette année là (visite d'automne).

Unité épidémiologique	Rucher								Colonie							
	2002		2003		2004		2005		2002		2003		2004		2005	
Mycose*	6	(27,3)	19	(79,2)	20	(87,0)	16	(72,7)	15	(13,6)	59	(43,4)	79	(58,4)	52	(40,0)
Couvain chauve	3	(13,6)	23	(95,8)	23	(100)	20	(90,9)	8	(7,3)	71	(52,2)	85	(63,0)	60	(43,2)
Spores de <i>Nosema sp.</i>	3	(13,6)	19	(79,1)	18	(78,3)	11	(50)	3	(2,7)	50	(36,8)	66	(48,9)	26	(20,0)
Forte infestation par varroa	11	(50,0)	11	(45,8)	8	(34,8)	9	(40,9)	25	(22,7)	22	(16,2)	20	(14,8)	30	(23,8)
Loque américaine	5	(22,7)	9	(37,5)	9	(39,1)	7	(31,8)	8	(7,3)	15	(11,0)	11	(8,1)	10	(7,7)
Loque européenne	5	(22,7)	7	(29,2)	5	(21,7)	4	(18,2)	8	(7,3)	7	(5,2)	11	(8,2)	4	(3,0)

* Mycose à *Ascosphaeras apis*

Tableau 7: Nombre (et pourcentage entre parenthèses) des traitements mis en oeuvre contre *V. destructor* dans les 24 ruchers suivis.

		Aucun	Apivar©	Apiguard©	Apistan©	Coumaphos	Autre ¹
2002	Automne	1 (4,2)	6 (25,0)	5 (20,8)	1 (4,2)	7 (29,2)	4 (16,7)
2003	Printemps	16 (66,7)	3 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (12,5)	2 (8,3)
	Automne	5 (20,8)	8 (33,3)	4 (16,7)	0 (0,0)	2 (8,3)	5 (20,8)
2004	Printemps	9 (37,5)	7 (29,2)	2 (8,3)	0 (0,0)	3 (12,5)	3 (12,5)
	Automne	2 (8,3)	11 (45,8)	2 (8,3)	0 (0,0)	2 (8,3)	7 (29,2)
2005	Printemps	8 (33,3)	7 (29,2)	1 (4,2)	0 (0,0)	3 (12,5)	5 (20,8)
	Automne	3 (12,5)	9 (37,5)	1 (4,2)	0 (0,0)	2 (8,3)	9 (37,5)

1 : cette catégorie regroupe les applications d'acide oxalique ou formique, de thymol, d'Apilife Var© ou d'une préparation "maison".

Tableau 8 : Résultats du modèle linéaire mixte final ajusté en fonction du niveau de population.

Variables	Valeur estimée	Ecart-type	Seuil de probabilité
Facteur constant	-0.39	0.08	
Visite			
Sortie de l'hiver	0		
Printemps	1.49	0.10	<0.0001
Été	1.02	0.07	<0.0001
Automne	-0.21	0.04	<0.0001
Couvain plâtré			
Non	0		
Oui	0.10	0.04	0.0354
Conduite du rucher			
Bonne	0		
Moyenne	-0.19	0.09	0.0543
Insuffisante	-0.40	0.10	0.0012

Tableau 9: Résidus de pesticides dans les échantillons collectés pendant le suivi. On a considéré comme positif pour la substance recherchée tout échantillon pour lequel la valeur trouvée du résidu a été supérieure à la LOD (Limite de détection).

Matrices	Pollen		Miel		Abeilles		Cire	
	Nombre d'échantillons analysés	Proportion d'échantillons positifs (%)	Nombre d'échantillons analysés	Proportion d'échantillons positifs (%)	Nombre d'échantillons analysés	Proportion d'échantillons positifs (%)	Nombre d'échantillons analysés	Proportion d'échantillons positifs (%)
Azinphos-méthyl	198	0,0	229	4,4	307	0,0	54	5,6
Carbaryl	126	13,5	227	0,9	214	0,5	0	-
Carbofuran	181	4,4	239	1,3	293	0,7	0	-
Coumaphos	198	5,1	236	8,5	307	4,6	92	46,7
Deltaméthrine	198	0,5	239	0,8	307	5,9	87	1,1
Endosulfan	198	7,6	239	0,0	307	5,5	93	12,9
Fipronil ¹	185	12,4	239	1,7	187	9,1	0	-
Fongicides ²	181	16,0	140	0,7	305	9,2	93	1,1
Imidaclopride ³	185	57,3	239	29,7	187	26,2	0	-
Lindane	198	1,5	239	0,8	307	2,3	87	2,3
Tau-Fluvalinate	198	3,5	226	0,9	307	4,6	67	52,2

1 : inclut le fipronil et ses métabolites fipronil sulfone et fipronil désulfinyl.

2 : inclut les fongicides suivants : penconazole, procymidone, propiconazole, tébuconazole, tétraconazole et vinclozoline.

3 : inclut l'imidaclopride et son métabolite l'acide 6-chloronicotinique.

Tableau 10 : Associations significatives de résidus de pesticides dans les matrices apicoles dans le même rucher lors de la même visite.

1 : inclut le fipronil et ses métabolites fipronil sulfone et fipronil désulfanyl.

Matrices	Substances actives présentes dans le même prélèvement		Significativité de l'association (test du Chi ²)	Nombre d'observations / Nombre total d'analyses
Abeilles	Epoxyconazole	Imidaclopride	0,007	3/186
	Epoxyconazole	Tébuconazole	0,000	4/303
	Tébuconazole	Fluzilazole	0,006	1/277
	Imidaclopride	Tébuconazole	0,039	2/187
	Imidaclopride	Tau-Fluvalinate	0,017	3/186
	Lindane	Tau-Fluvalinate	0,000	4/307
	Myclobutanil	Tau-Fluvalinate	0,001	2/302
	Deltaméthrine	acide 6-chloronicotinique	0,047	3/186
	Deltaméthrine	Coumaphos	0,000	4/307
Pollen	Carbaryl	Tébuconazole	0,002	3/126
	Coumaphos	Endosulfan	0,006	3/198
	Fipronil ¹	Imidaclopride	0,034	14/185

Tableau 11 : Associations significatives de la contamination de deux matrices différentes par les mêmes substances actives dans le même rucher lors de la même visite.

Substances actives	Matrices		Probabilité Chi ² (Odd ratio)
Fipronil ¹	Pollen	Abeilles	0,018 (7,00)
Imidaclopride ²	Pollen	Abeilles	0,057 (2,26)
	Pollen	Miel	0,112 (1,86)

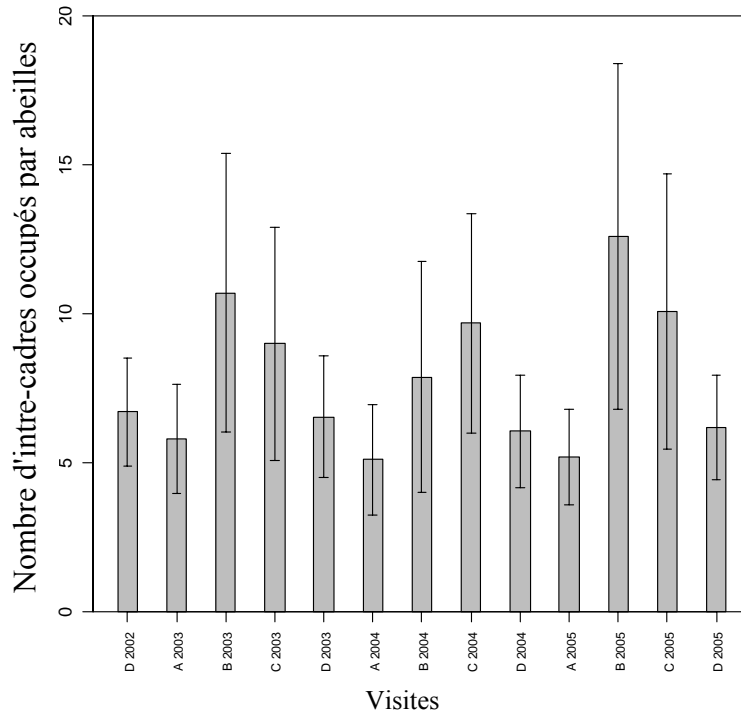
1 : inclut le fipronil et ses métabolites fipronil sulfone et fipronil désulfanyl.

2 : inclut l'imidaclopride et son métabolite l'acide 6-chloronicotinique.

Tableau 12: Résultats des modèles de régression conditionnelle logistique expliquant la mortalité soit par la présence de (a) coumaphos et (b) endosulfan . L'unité épidémiologique est le rucher. Les effets de la mortalité hivernale et l'interaction (pesticide x mortalité hivernale) sont également testés. La significativité de chaque effet (P), ainsi que l'Odds Ratio (OR) associé et son intervalle de confiance à 95% sont donnés.

(a)			
Variables	P	OR	CI ₉₅
Hiver (Oui/Non)	0.08	3.1	[0.9-10.5]
Présence de coumaphos (Oui/Non)	0.36	2.0	[0.45-8.9]
Interaction Hiver x coumaphos	0.86	0.8	[0.1-6.4]
(b)			
Variables	P	OR	CI ₉₅
Hiver (Oui/Non)	0.02	3.1	[1.2-8.4]
Présence de endosulfan (Oui/Non)	0.42	1.9	[0.4-9.3]
Interaction Hiver x endosulfan	0.84	1.3	[0.1-11.5]

a



b

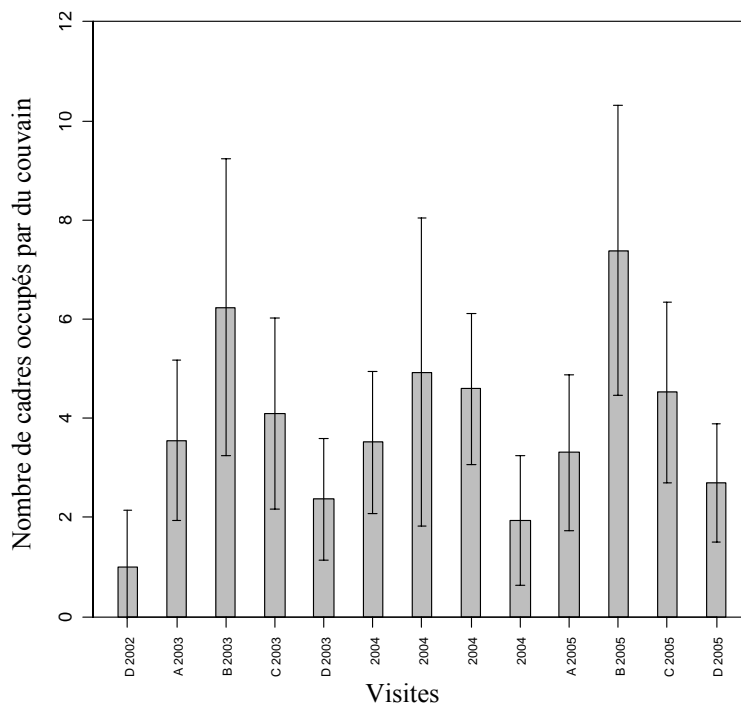


Figure 1. **a** :Variation saisonnière du niveau moyen de la population d'abeilles adultes estimée par le nombre moyen d'inter-cadres occupés par des abeilles adultes.

b : Variation saisonnière du niveau moyen de la population d'abeilles non adulte estimée par le nombre moyen de cadres occupé par du couvain operculé et non operculé.

La barre verticale représente ± 1 écart-type des valeurs observées.

Pour a et b, le nombre de colonies visitées a varié de 110 à 120 en fonction des conditions d'observation.

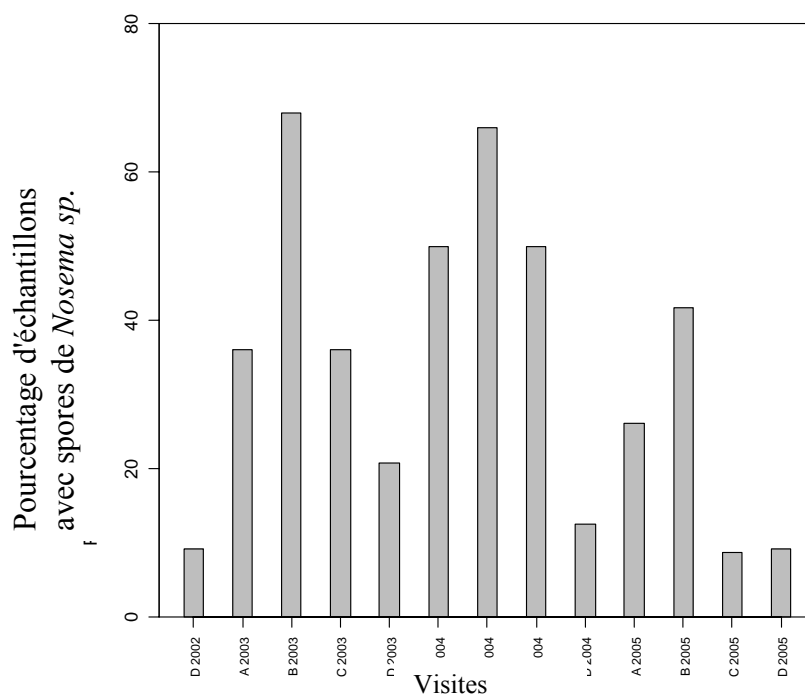


Figure 2 : Présence de spores de *Nosema sp.* dans les échantillons d'abeilles adultes vivantes (pourcentage rapporté au nombre d'échantillons analysés).

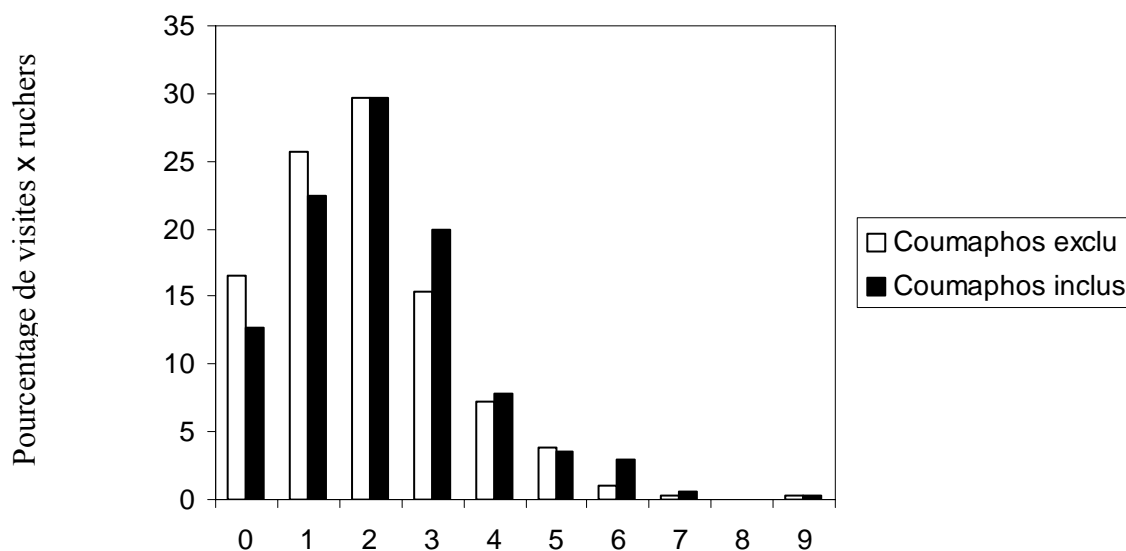


Figure 3. Distribution des visites x ruchers en fonction du nombre de résidus différents trouvés dans l'ensemble des échantillons récoltés au cours d'une visite dans un rucher donné (avec ou sans prise en compte du coumaphos). Chaque substance a été prise en compte une fois si elle a été mise en évidence dans une ou plusieurs des matrices analysées : abeilles, miel, pollen, cire. Statistiques établies pour toute la durée de l'étude, soit au total : 307 visites x ruchers.

References

- Aajoud, A., M. Raveton, H. Aouadi, M. Tissut, and P. Ravanel. 2006. Uptake and xylem transport of fipronil in sunflower. *J Agr.Food Chem.* **54**:5055-5060.
- Borchert A. 1970. Les maladies et parasites des abeilles. Vigot Frères Editeurs, Paris.
- Brunet, J. L., A. Badiou, and L. P. Belzunces. 2005. *In vivo* metabolic fate of [C-14]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* **61**:742-748.
- Chauzat, M. P., and J. P. Faucon. 2007. Pesticides residues in beeswax samples collected from honey-bee colonies (*Apis mellifera*) in France. *Pest Management Science* **63**:1100-1106.
- Chauzat, M. P., J. P. Faucon, A. C. Martel, J. Lachaize, N. Cougoule, and M. Aubert. 2006. A survey on pesticide residues in pollen loads collected by honey-bees (*Apis mellifera*) in France. *Journal of Economic Entomology* **99**:253-262.
- Chauzat, M. P., M. Higes, R. Martin-Hernandez, A. Meana, N. Cougoule, and J. P. Faucon. 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* **46**:127-128.
- Cohen, J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* **20**:37-46.
- Currie, R. W., and P. Gatién. 2006. Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *Canadian Entomologist* **138**:238-252.
- DeGuzman, L. I., T. E. Rinderer, M. Bigalk, H. Tubbs, and S. J. Bernard. 2005. Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies: *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) infestations and overwintering survival. *J Econ.Entomol.* **98**:1796-1801.
- Delaplane, K. S., J. A. Berry, J. A. Skinner, J. P. Parkman, and W. M. Hood. 2005. Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold. *J.Apicult.Res.* **44**:157-162.
- Delaplane, K. S., and W. M. Hood. 1997. Effects of delayed acaricide treatment in honey bee colonies parasitized by *Varroa jacobsoni* and a late-season treatment threshold for south-eastern. *Journal of Apicultural Research* **36**:125-132.
- Delaplane, K. S., and W. M. Hood. 1999. Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie* **30**:383-395.
- Direction Générale de l'Alimentation. 2006. Actualisation des listes de maladies réglementées. Notes de Service .
- Erickson, E. H., B. J. Erickson, and J. A. Wyman. 1994. Effects on honey bees of insecticides applied to snap beans in Wisconsin: chemical and biotic factors. *Journal of Economic Entomology* **3**:596-600.

- Faucon J. P. 1992. Précis de pathologie apicole : connaître et traiter les maladies des abeilles. CNEVA/FNOSAD.
- Faucon, J. P., C. Aurières, P. Drajnudel, L. Mathieu, M. Ribière, A. C. Martel, S. Zeggane, M. P. Chauzat, and M. Aubert. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Management Science* **61**:111-125.
- Flores, J. M., I. Gutierrez, and R. Espejo. 2005. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia* **97**:1171-1176.
- Fries, I. 1993. *Nosema apis* - A parasite in the honey bee colony. *Bee World* **74**:5-19.
- Fries, I., A. Imdorf, and P. Rosenkranz. 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie* **37**:564-570.
- Gilliam, M. 1978. Chalkbrood-status today and hopes for control. *American Bee Journal* 468-471.
- Gunasekara, A. S., T. Truong, K. S. Goh, F. Spurlock, and R. S. Tjeerdema. 2007. Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science* **32**:189-199.
- Hassanein, M. H. 1951. Studies on the effect of infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey-bee. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **92**:225-231.
- Heath, L. A. F. 1982. Development of chalk brood in honeybee colony : a review. *Bee World* **63**:119-130.
- Iwasa, T., N. Motoyama, T. Ambrose, and R. M. Roe. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* **23**:371-378.
- 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). *J Econ.Entomol.* **90**:473-482.
- Koenig, J. P., G. M. Boush, and E. H. Erickson. 1987. Effects of spore introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood disease in honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research* **26**:191-195.
- Laird, N. M., and J. H. Ware. 1982. Random-effect models for longitudinal data. *Biometrics* **38**:963-974.
- Landis, J., and G. G. Koch. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**:159-174.
- Laurent, F. M., and E. Rathahao. 2003. Distribution of [(14)C]imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *J Agric.Food Chem.* **51**:8005-8010.
- Le Faouder, J., E. Bichon, P. Brunschwig, R. Landelle, F. Andre, and B. Le Bizec. 2007. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta* **73**:710-717.
- Maxim, L., and J. P. van der Sluijs. 2007. Uncertainty: cause or effect of stakeholders' debates? Analysis of a case study: the risk for honeybees of the insecticide Gaucho. *Sci.Total Environ.* **376**:1-17.
- OIE. 2000a. Acariosis of bees. Pages 778-783 *in* Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.

- OIE. 2000b. European foulbrood. Pages 789-792 *in* Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.
- OIE. 2000c. Nosemosis of bees. Pages 793-795 *in* Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.
- Pinheiro J. C., and D. M. Bates. 2000. Mixed-effect models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New-York.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org> . 2007. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. Ref Type: Report
- Root A. I. 1990. Abc and xyz of bee culture., 40th Edition edition. The A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA.
- Roper, M. 2002. Fipronil, Résumé du dossier toxicologique. Bayer CropScience 1-85.
- Schmickl, T., and K. Crailsheim. 2001. Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *J Comp Physiol [A]* **187**:541-547.
- Schmickl, T., and K. Crailsheim. 2002. How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behaviour in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. *Behav.Ecol.Sociobiol.* **51**:415-425.
- Suchail, S., S. G. De, R. Rahmani, and L. P. Belzunces. 2004. In vivo distribution and metabolisation of ¹⁴C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest.Manag.Sci.* **60**:1056-1062.
- Szabo, T. I., and D. C. Szabo. 2003. Varroa infestation levels and honey bee colony characteristics in the final year of a breeding program. *Amer.Bee J* **October**:798-802.
- Thomas, L., and A. Manica. 2003. Filial cannibalism in an assassin bug. *Animal Behaviour* **66**:205-210.
- Webster, T. C., and Y. S. Peng. 1987. Passage of cannibalized tissue among honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colony members. *Ann.Entomol.Soc.Am.* **80**:814-819.