



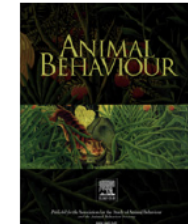
# Approche expérimentale des mortalités inexplicées de colonies d'abeilles en Wallonie

Noa Simon<sup>1</sup>, Coralie Mouret<sup>1</sup>, Etienne Bruneau<sup>1</sup>, Bach Kim Nguyen<sup>2</sup>, Eric Haubruge<sup>2</sup>, Louis Hautier<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centre Apicole de Recherche et d'information

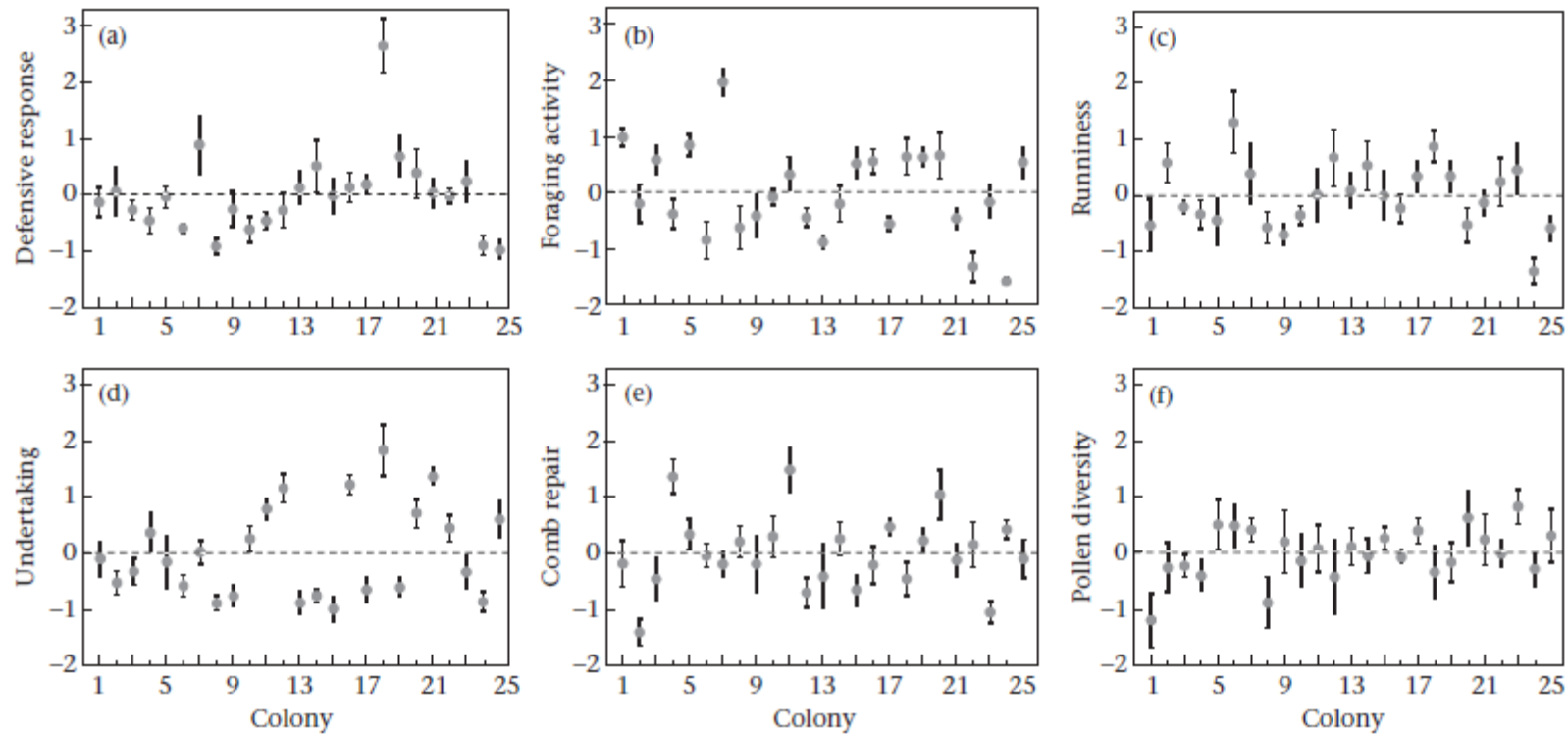
<sup>2</sup> Gembloux Agro-BioTech, ULG

<sup>3</sup> Centre wallon de Recherches agronomiques



## Collective personalities in honeybee colonies are linked to colony fitness

Margaret K. Wray<sup>a,\*</sup>, Heather R. Mattila<sup>b,1</sup>, Thomas D. Seeley<sup>a</sup>



**Figure 1.** Average scores of the 25 honeybee colonies on six behavioural tests: (a) defensive response, (b) foraging activity, (c) runniness, (d) undertaking, (e) comb repair and (f) pollen diversity. The overall average for all 25 colonies is indicated with a dashed line. Behavioural responses are plotted using standardized scores to account for test-to-test variation in average scores across all 25 colonies.

# **Introduction**

## **Objectifs du projet**

**Partie systématique : « approche expérimentale »**

**Partie ponctuelle : « étude de cas »**

## **Matériel et méthodes**

**Réseau de ruchers**

**Stratégie d'échantillonnage des matrices**

**Analyses des matrices**

## **Calendrier**

# Introduction



# Mais où sont passées les abeilles ?

*Un insecticide serait responsable de leur mort. Les apiculteurs craignent le scandale.*

## Les abeilles tombent comme des mouches

*Des apiculteurs du Morbihan voient leurs ruches décimées et accusent les pesticides.*

## L'insecticide qui fait tourner en bourrique abeilles et chercheurs

*Le Gaucho est suspecté de tuer les butineuses. L'expertise n'a pas conclu.*

Les apiculteurs accusent un insecticide de tuer les abeilles

# Le Gaucho® est-il l'ennemi des abeilles ?

Sources: Libération 3.09.1999,  
21.05.2002, 8.01.1999, Le Monde  
18.04.1998, La Recherche 2001

# Bref historique

## France

Début 90' commercialisation de l'imidacloprid

1994 agréation en tournesol

1996-97 observation de mortalités anormales

=> suspension agréation (toujours effective en 10.02.2012)

1999 Tournesol Gaucho, Régent TS

2004 Maïs Gaucho

toujours autorisé en orge et en betterave

# Bref historique

## Belgique

Imidacloprid agréé en enrobage depuis 1992 : betterave, orge ,  
(maïs 2-3%)

Problèmes de dépérissement / affaiblissement observés (Lefebvre &  
Bruneau, 2005)

1996 (3 ruchers), 1999 (4), 2000 (1), 2001 (4), 2002 (5)

Etude	Années	Type d'enquête	Nombre d'apiculteurs	Nombre de colonies	Mortes	Mortes vides	Affaiblies
CARI	2003-2004	Enquête générale	282	2992	437 14.61%		473 15.81%
	2003-2004	Tirage au sort	120	1337	158 11.82%		199 14.88%
Gbx-ABT	2008-2009	Questionnaire online	176	2095	416 19.86%	71 3.39%	
	2009-2010	Questionnaire online	156	3131	863 27.56%	440 14.05%	

# Hypothèses au sujet du dépérissement

- **(Ressources alimentaires)**
- **Parasites** : *Varroa destructor*
- **Maladies** : viroses, loques, nosémose,...
- **Pesticides** : néonicotinoïdes, phenylpyrazoles,...
- ....



# Les virus

## **Les virus détectés en Europe** (Yang & Cox-Foster 2005, Tentcheva et al. 2004)

- **CBPV** (Chronic bee paralysis virus) - virus de la paralysie chronique
- **ABPV** (Acute bee paralysis virus) - virus de la paralysie aiguë
- **DWV** (Deformed wing virus ) - virus des ailes déformés
- **SBV** (Sacbrood virus) - virus du couvain sacciforme
- **BQCV** (Black queen-cell virus) - cellule noire de la reine
- **KBV** (Kashmir bee virus ) - virus du Cachemire

# Les virus

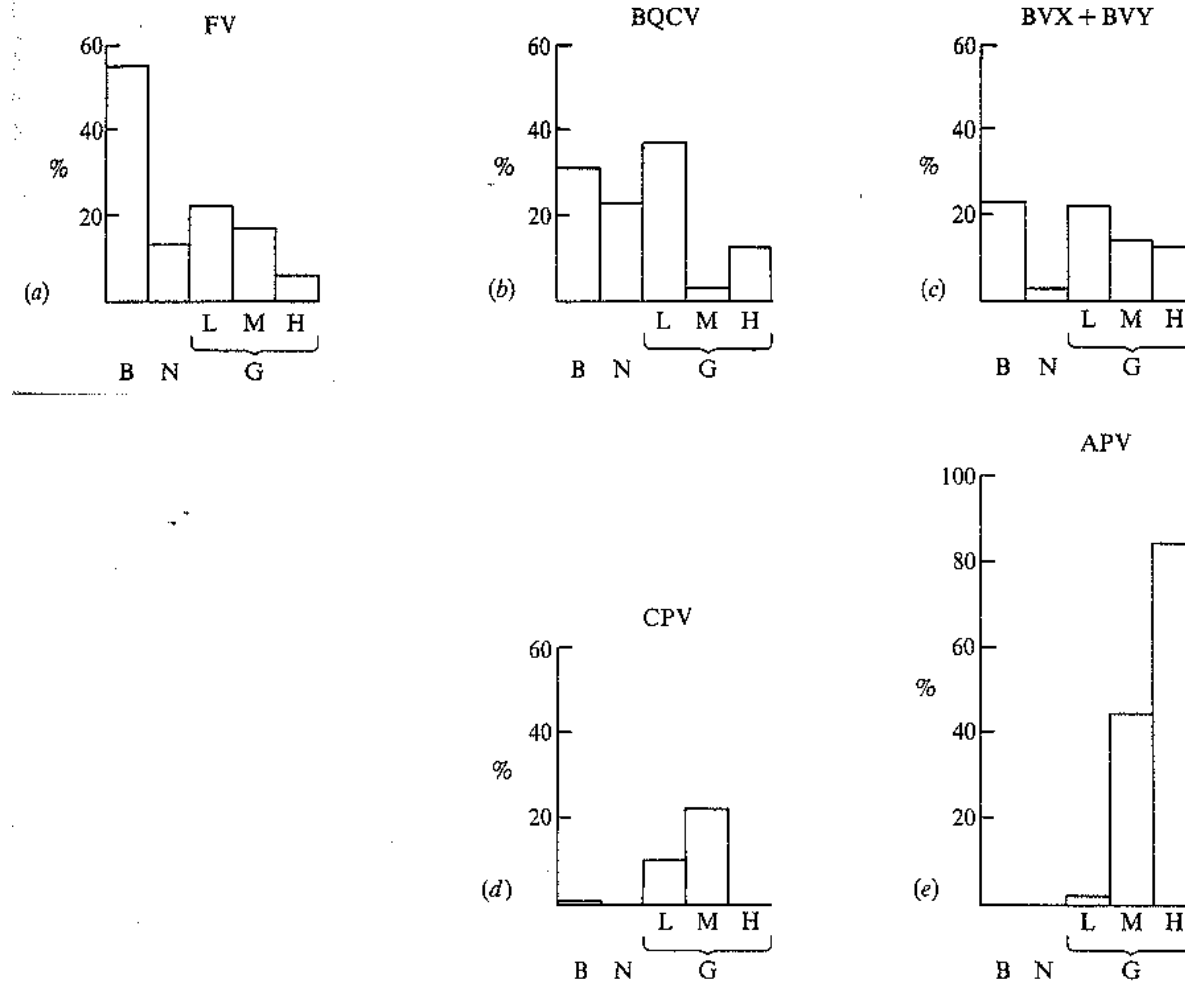
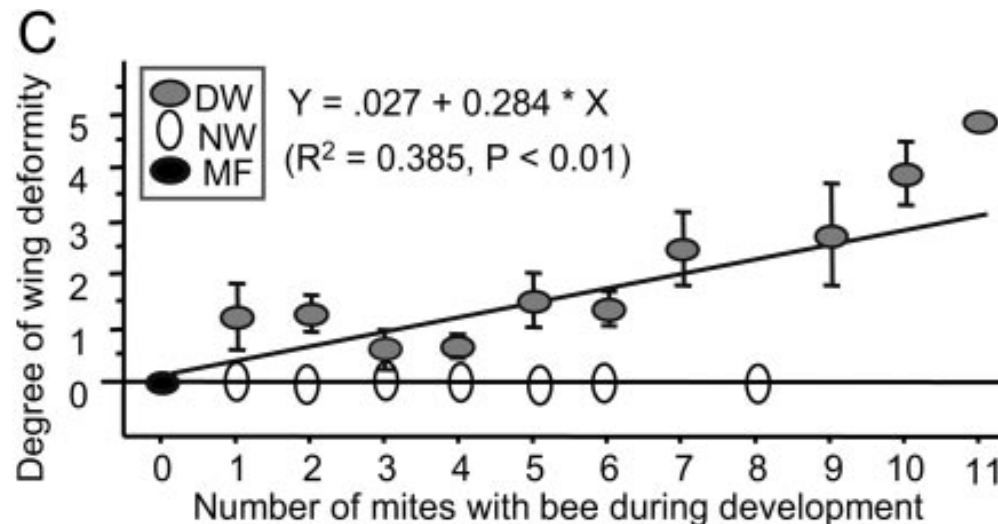


Fig. 1. Percentage of dead adult bee samples from honey bee colonies in Britain (B), the Netherlands (N), and Germany (G), in which (a) filamentous bee virus (FV), (b) black queen cell virus (BQCV), (c) bee virus X and bee virus Y (BVX + BVY) (d) chronic paralysis virus (CPV) and (e) acute paralysis virus (APV) were detected. The German colonies were divided into three categories of infestation with *V. jacobsoni*; Low (L), Medium (M) and High (H).

# Les virus

## Augmentation de l'impact des virus du à la présence de *Varroa destructor* (Yang & Cox-Foster 2005 PNAS 10 2: 7470-7475)

- vecteur
- percement cuticule
- diminution du système immunitaire



**DW** : mite infested and deformed-wing, **NW**: mite-infested but normal-winged, **MF**: Mite Free

## High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health

Christopher A. Mullin<sup>1\*</sup>, Maryann Frazier<sup>1</sup>, James L. Frazier<sup>1</sup>, Sara Ashcraft<sup>1</sup>, Roger Simonds<sup>2</sup>, Dennis vanEngelsdorp<sup>3</sup>, Jeffery S. Pettis<sup>4</sup>

### Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France

Marie-Pierre Chauzat\* and Jean-Paul Faucon

AFSSA. Les Templiers. 105 route des Chappes. BP 111- F-06 902 Sophia-Antipolis Cedex, France



APICULTURE AND SOCIAL INSECTS

#### A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France

MARIE-PIERRE CHAUZAT, JEAN-PAUL FAUCON, ANNE-CLAIRE MARTEL, JULIE LACHAIZE,  
NICOLAS COUGOULE, AND MICHEL AUBERT

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Les Templiers, 105 route des Chappes, B.P. 111,  
F-06 902 Sophia-Antipolis Cedex, France

# Les pesticides

## Résidus détectés

miel

7 s.a. détectées / 20 s.a. recherchées (n= 100) [Pirard *et al.* 2007]

pollen de trappe

19 s.a. détectées / 36 s.a. recherchées (n= +/- 80) [Chauzat *et al.* 2006 ]

98 s.a. détectées / 200 s.a. recherchées (n= +/-350) [Mullin *et al.* 2010]

cire

87 s.a. détectées / 200 s.a. recherchées (n=+/-259) [Mullin *et al.* 2010]

14 s.a. détectées / 18 s.a. recherchées (n= 125) [Chauzat & Faucon 2007]

abeilles

46 s.a. détectées / 200 s.a. recherchées (n=140) [Mullin *et al.* 2010]

# Les pesticides

## Types de résidus détectés :

Acaricides contre *V. destructor*: tau-fluvalinate, coumaphos, rotenone,...

Insecticides : orgno-P, pyréthrénoïdes, néonicotinoïdes,...

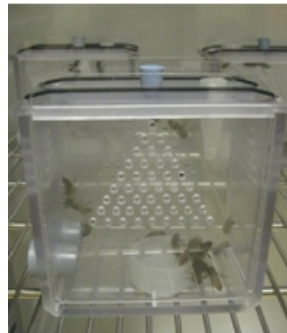
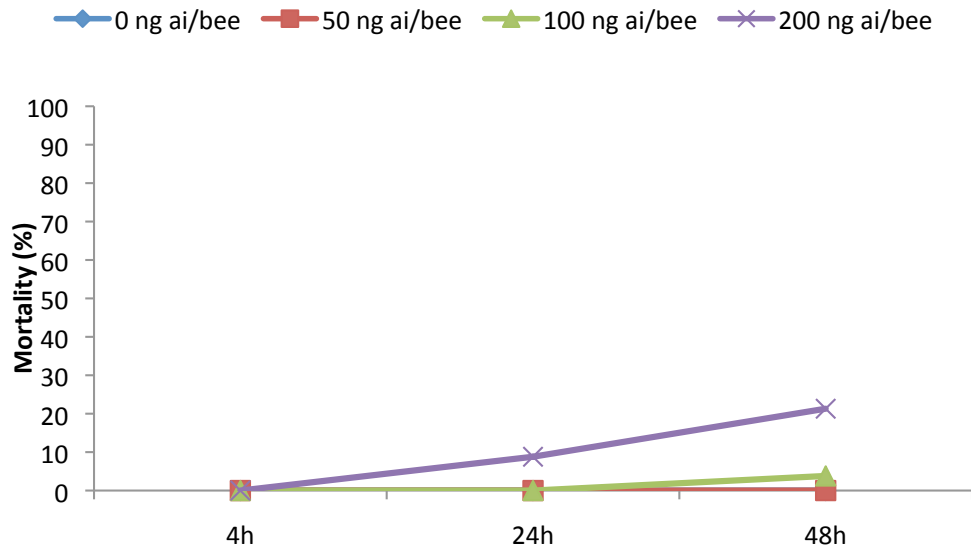
Fongicides : chloronitriles, strobilurines, carboxamides,...

Herbicides : dinitroanilines, triazines, carbamates...

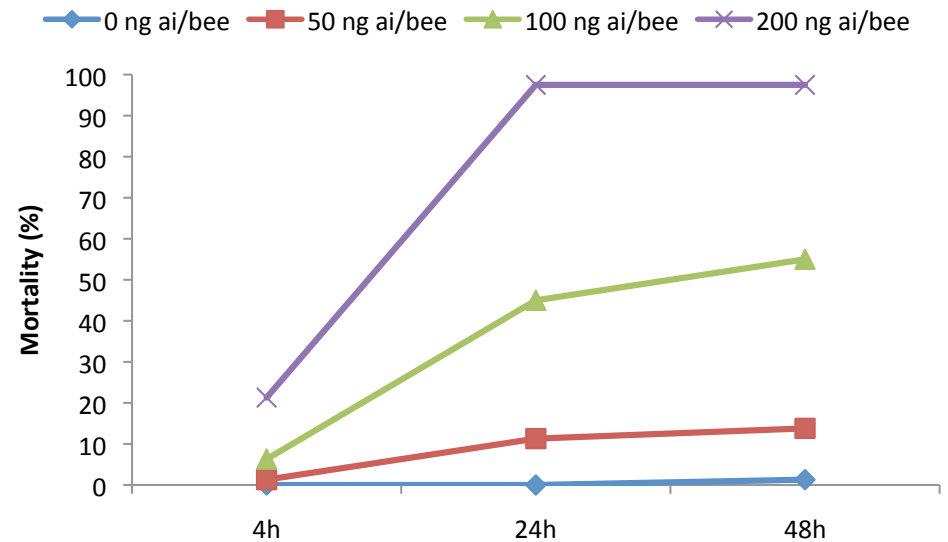
**=> *Produits systémiques et non systémiques***

# Impact des pesticides sur les abeilles : létal

**Dimethoate**  
**contact exposition**  
LD50 : 334 ng ai/bee



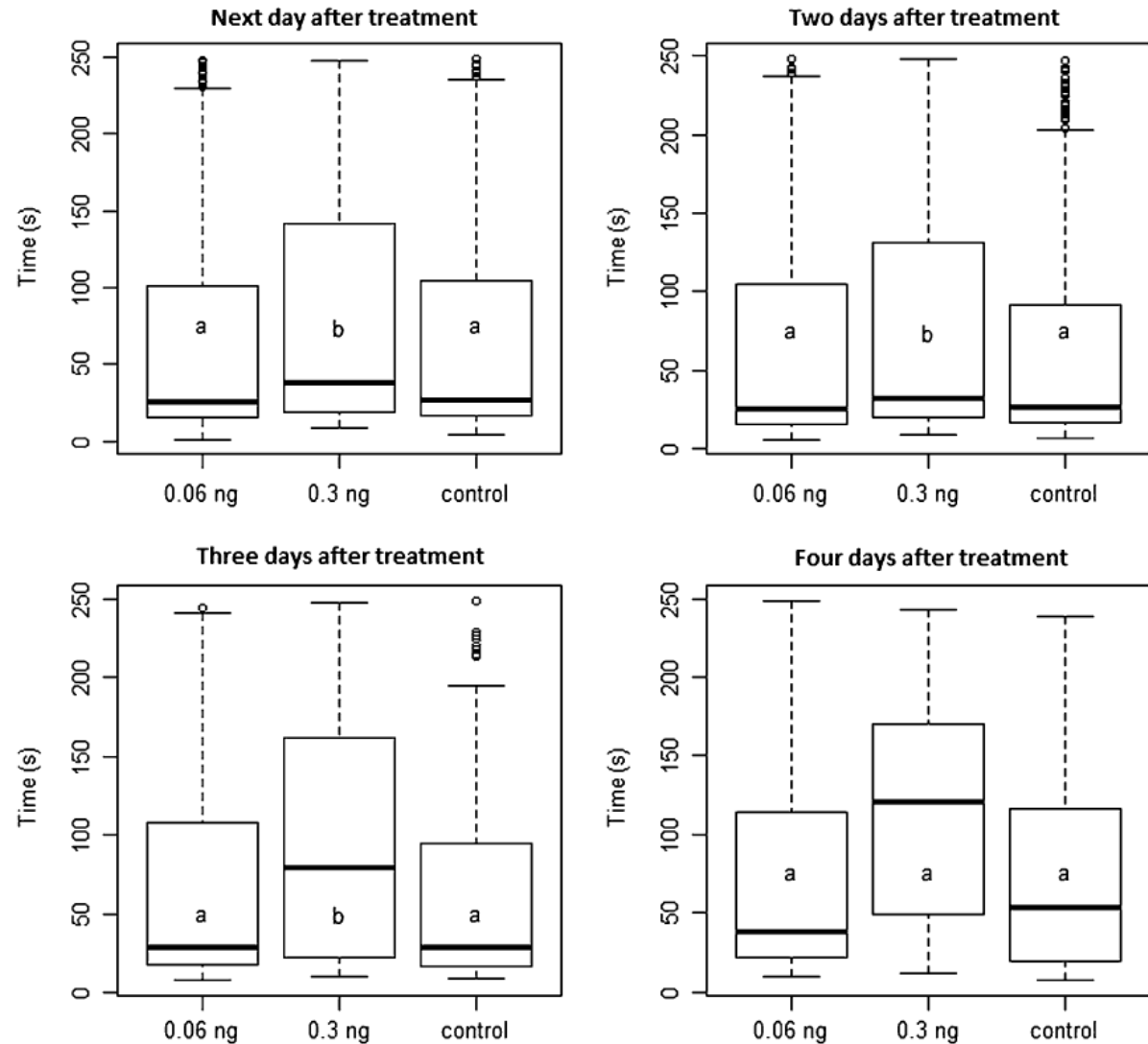
**Dimethoate**  
**oral exposition**  
LD 50 : 93 ng ai/bee



# Impact des pesticides sur les abeilles : sublétal

**Fig. 4** Time of homing flights according to treatment.  
n\* for next day after treatment = 1537, 1791, 891.  
n\* for 2 days after treatment = 938, 940, 520.  
n\* for 3 days after treatment = 269, 437, 157.  
n\* for 4 days after treatment = 92, 228, 40.  
Different letters indicate significant difference with pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test ( $P$  value adjusted by Bonferroni method:  $P < 0.025$ ).  
\* n: number of trips for control, 0.06 and 0.3 ng, respectively

**Fipronil**  
**oral exposition**  
**0.06 and 0.3 a.i. ng/bee**  
**(LD50: oral 6 a.i. ng/bee)**





# Interactions: pesticide \* pesticide

Pretreatment effect of general insecticide synergists, DMI-fungicides, and a plant growth regulator on honey bee toxicity of neonicotinoid insecticides

Insecticide synergist <sup>a</sup>	<i>n</i> <sup>b</sup>	LD <sub>50</sub> (µg/bee) <sup>c</sup>	95% CI <sup>d</sup>	Chi-square	Slope ± SE	SR <sup>e</sup>	95% CI <sup>e</sup>
<b>Acetamiprid</b>							
Alone	465	7.07	4.57–11.2	0.826	1.77 ± 0.105	1	
PBO	202	1.17	0.342–3.79	1.18	1.55 ± 0.181	6.04	4.29–8.51
DEF	124	2.39	0.278–12.4	5.85	2.96 ± 0.736	2.96	1.83–4.76
DEM	123	6.94	4.10–13.2	0.278	1.46 ± 0.140	1.02	0.783–1.33
Triflumizole	215	0.0290	0.0080–0.102	3.46	1.91 ± 0.240	244	171–347
Propiconazole	201	0.0675	0.0231–0.197	2.63	2.30 ± 0.242	105	76.7–143
Triadimefon	131	0.0844	0.0431–0.176	0.693	2.05 ± 0.198	83.8	64.2–110
Epoxiconazole	156	0.500	0.156–1.66	4.42	2.74 ± 0.404	14.1	10.0–20.0
Uniconazole-P	156	1.12	0.270–4.96	3.66	2.05 ± 0.349	6.31	4.22–9.45
<b>Imidacloprid</b>							
Alone	137	0.0179	0.0092–0.0315	0.303	1.70 ± 0.176	1	
PBO	152	0.0105	0.0061–0.0172	0.0889	1.66 ± 0.112	1.70	1.29–2.26
Triflumizole	125	0.0097	0.0052–0.0168	0.694	2.76 ± 0.284	1.85	1.67–3.09
Propiconazole	145	0.0118	0.0038–0.0303	1.01	2.12 ± 0.272	1.52	1.04–2.24
<b>Thiacloprid</b>							
Alone	158	14.6	9.53–25.4	0.480	2.73 ± 0.371	1	
PBO	193	0.0948	0.0406–0.211	0.424	1.64 ± 0.134	154	115–207
Triflumizole	160	0.0128	0.0031–0.0415	1.66	2.32 ± 0.363	1141	752–1740
Propiconazole	159	0.0261	0.0083–0.0690	1.05	2.27 ± 0.298	559	388–811

<sup>a</sup> In all, 10 µg of synergist was applied to the dorsal thorax of each worker honey bee 1 h prior to insecticide application.

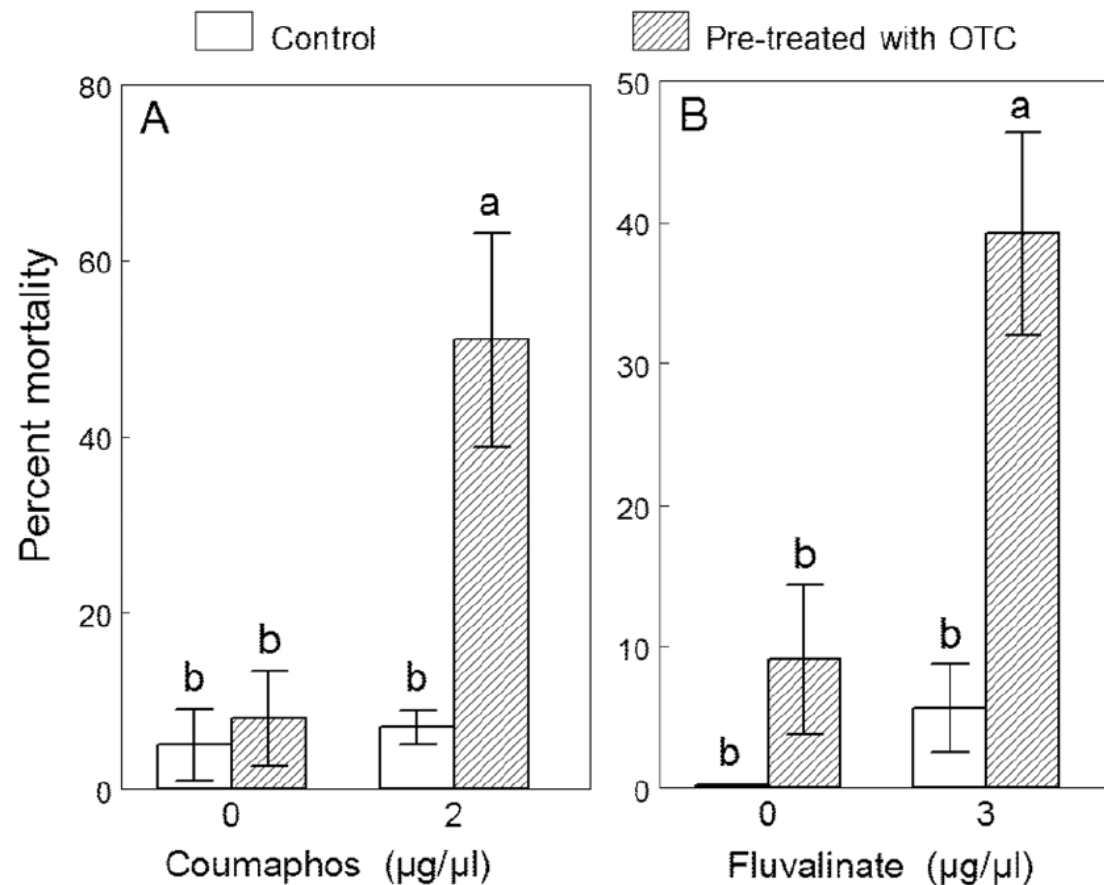
<sup>b</sup> Number of insects tested.

<sup>c</sup> Results were corrected for control mortality. Dose is given in micrograms of active ingredient.

<sup>d</sup> CI, confidence interval.

<sup>e</sup> SR, synergism ratio (the LD<sub>50</sub> of insecticide alone/LD<sub>50</sub> of synergist and the insecticide).

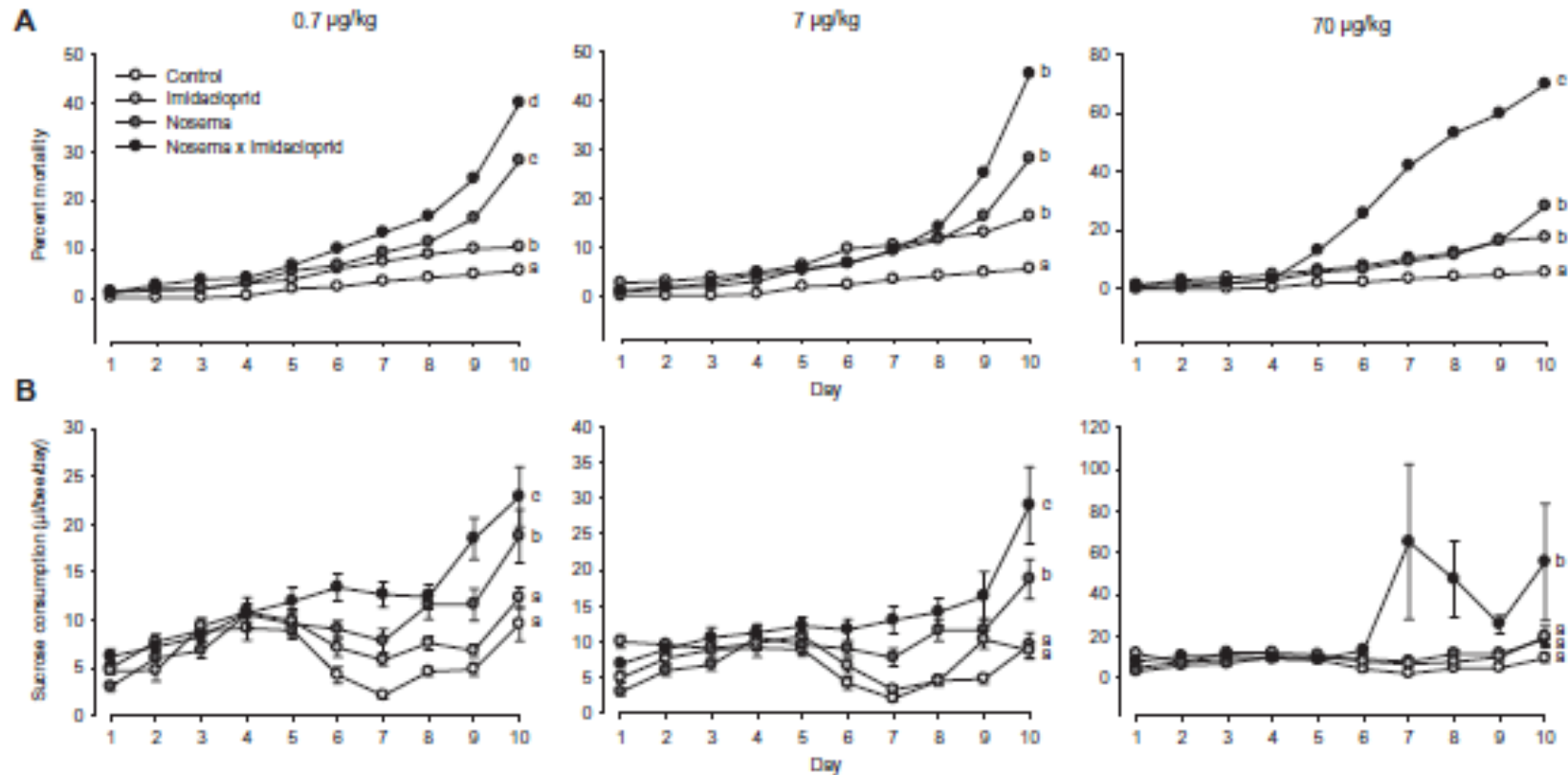
# Interactions : pesticide \* antibiotique



OTC = oxytetracycline  
Terramycin

**Figure 2. Oxytetracycline (OTC) synergizes honey bee mortality by in-hive acaricides.** Mean mortality ( $\pm$  SE) of honey bees pre-fed sucrose solution (50%) or sucrose+oxytetracycline (1.4 mM) and topical application of (A) coumaphos (average of 24 and 48 h) and (B)  $\tau$ -fluvalinate (24 h). For each pesticide, different letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0026796.g002

# Interactions: pesticide \* agent biologique



**Fig. 1.** Effect of *Nosema* infection and/or exposure to imidacloprid on bee mortality and energetic demands.

**A.** Effect on mortality. Mortality is expressed as the percentage of cumulated number of dead bees per cage and per day ( $n = 270$  bees).

Three colonies were analysed, with three cage replicates for each colony ( $n = 30$  bees per cage). Each letter indicates significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

**B.** Effect on energetic demand. Sucrose consumption is expressed as the amount of sucrose solution (50% w/v, *ad libitum* delivery) consumed per day and per bee ( $n = 30$  bees per cage) during the 10 h of treatment. The same cages as in A were analysed. Each letter indicates significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

# Interactions: pesticide \* agent biologique

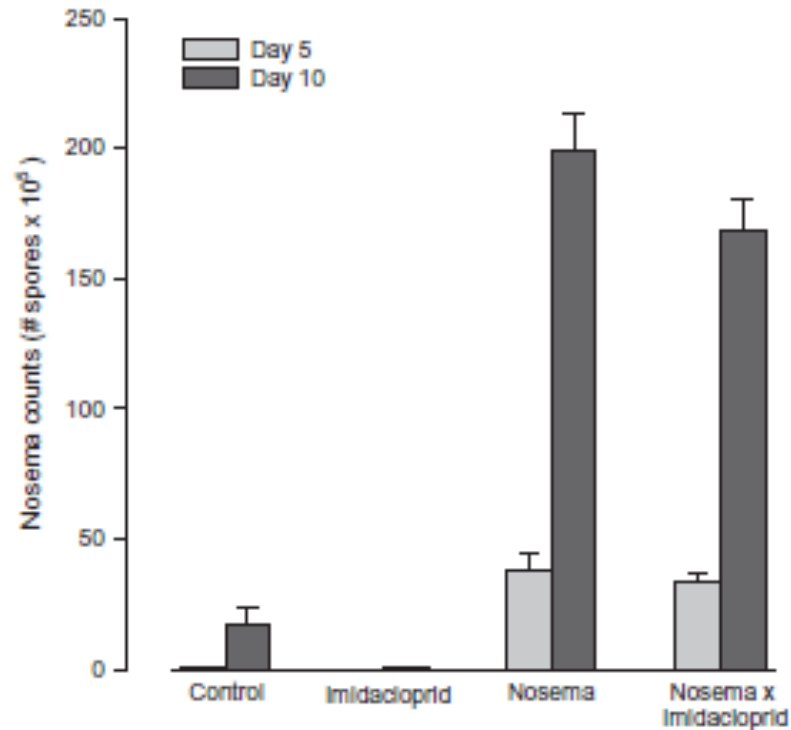
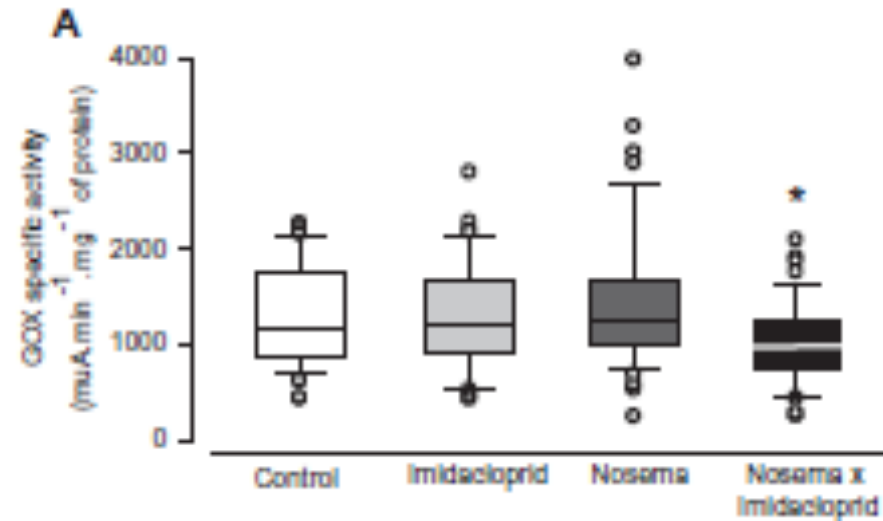


Fig. 2. Level of *Nosema* infection in bees fed with *Nosema* and/or exposed to imidacloprid. Level of infection was determined at days 5 and 10 on seven to eight bees per cage for each experimental group ( $n = 382$  bees). Three colonies were analysed, with two cage replicates for each colony. Data show mean  $\pm$  SE.



Glucose oxydase activity (GOX)

## Take home message

***Varroa destructor* renforce l'impact de certains virus.**

**L'abeille est exposée à une multitude de résidus de pesticides par le pollen, le miel, la cire.**

**L'évaluation des effets subléthaux est complexe.**

**Des interactions pesticide\*pesticide, pesticide\*antibiotique, pesticide\*agent biologique peuvent augmenter la toxicité d'un pesticide.**

# Objectifs du projet



# Le dépérissement, c'est quoi ?

*« tous les phénomènes provoquant des mortalités ou des affaiblissements importants et qui ne peuvent être lié directement à un agent pathogène ou à un contaminant »*

## **Phénomènes :**

- colonie morte, au complet, en fond de ruche ;
- disparition de tout ou partie de la colonie
- perte de la reine ou infertilité de celle-ci
- anomalie de construction

## **PAS les mortalités attribuables à**

- **une intoxication aigue (pesticides, acaricides,...)**
- **la varroa**
- **la famine**

## Partie systématique : « approche expérimentale »

**Déterminer la présence et l'abondance dans les colonies d'abeilles de**

**(1) virus**

**(2) résidus de pesticides** (acaricides, insecticides, fongicides, herbicides,...)

**Etudier s'il y a un lien ou pas avec le phénomène de dépérissement observé dans les ruches suivies**

## Partie ponctuelle : « étude de cas »

**Noter les incidents dans les colonies qui ne sont pas suivies par le projet.**



# Matériel et méthodes



# Réseau de ruchers en RW

## Détermination de l'effectif à suivre

- Prévalence du phénomène la plus faible : +/- 10%
- Besoin 30 colonies atteintes (analyses statistiques)  
=> 300 colonies à suivre
  
- Besoin 2 colonies atteintes par rucher
- Hypothèse prévalence du phénomène 50%  
=> 5 colonies/rucher  
=> 60 ruchers

# Réseau de ruchers en RW

## Sélection des apiculteurs

Limiter l'influence de facteurs liés à une mauvaise conduite ou à une méconnaissance de l'abeille, les apiculteurs auront :

- une bonne connaissance de l'abeille
- une conduite conformément au GBPA
- 5 colonies de production en Dadant-Blatt

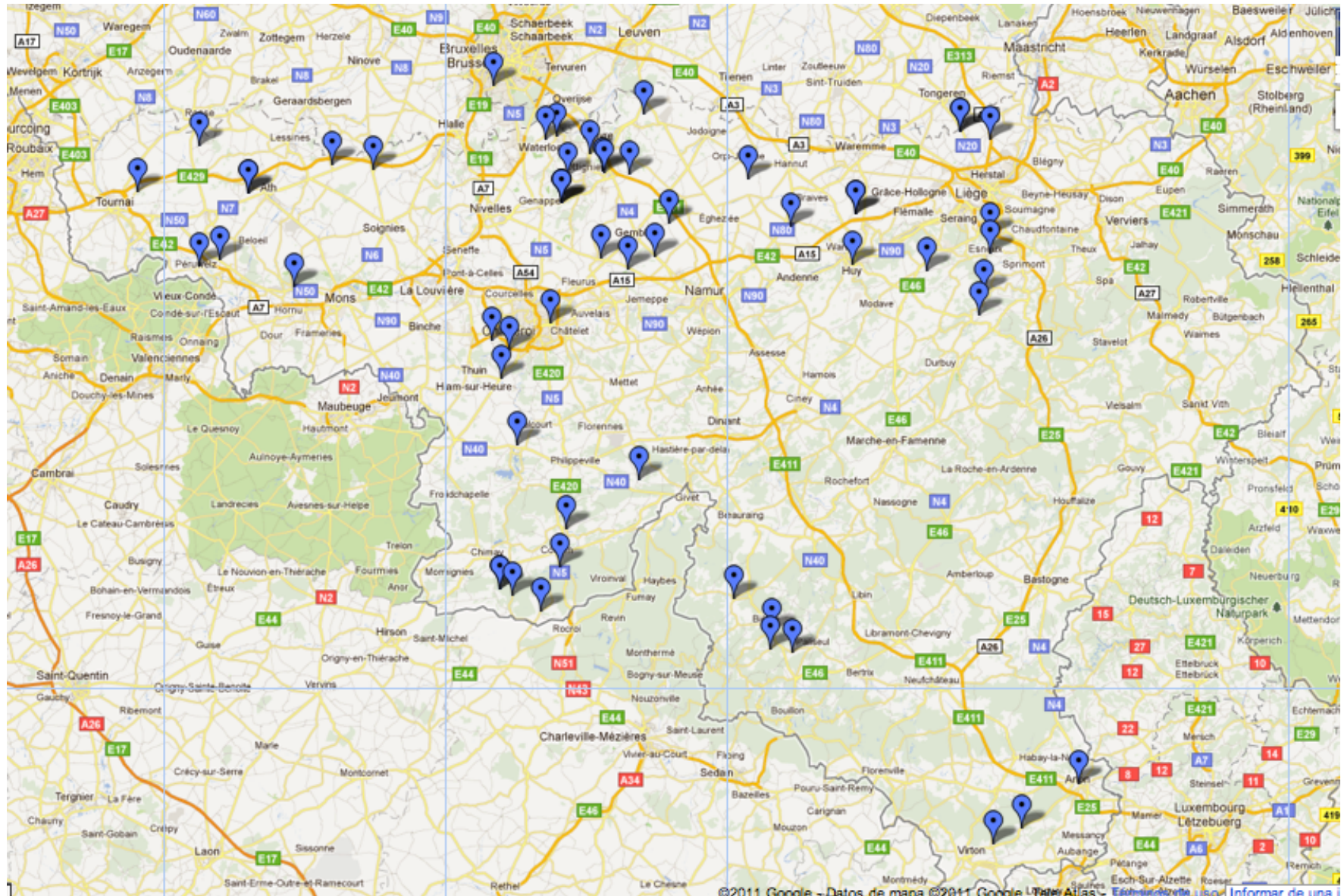
et pratiqueront :

- 2 traitements contre *V. destructor*
- le nourrissage
- des visites régulières (1 x/ semaine)

et accepteront

- que leurs ruches soient visitées et échantillonnées
- de réaliser des observations simples

# Réseau de ruchers en RW



# Réseau de ruchers en RW

## Suivi des ruchers par les assistants apicoles (15)

- Observer avec l'apiculteur et compléter les questionnaires sur
  - 1) apiculteur
  - 2) rucher
  - 3) ruche
- Prélever et transmettre les échantillons au CARI
- Encoder les observations sur les formulaires en ligne

# Observations réalisées

**Juillet-août / septembre- octobre / mars – avril**

## **Apiculteur**

informations générales (localisation, effectif,...)

environnement du rucher (culture, rucher,...)

traitement contre Varroa (méthode et produit de traitement, schéma,...)

nourrissement (période, type, quantité,...)

## **Rucher**

nourrissement

dynamisme du rucher – visite ( raison, date, ...)

état sanitaire du rucher (problèmes observés : affaiblissement, colonie vide, renouvellement reine, couvain anormal)

# Observations réalisées

## Ruche

traitement contre varroa (type, produit, ...)

état sanitaire :

- **mortalité** (localisation, description, période)
- **affaiblissement** (développement, pathologies, effectif, période)
- **problème de couvain** (mosaïque, mortalité larvaire,...)
- **pertes de reines**
- **réserves** (abondantes, moyennes, petites)
- **bourdonneuse**
- **fausse teigne**
- **varroa** (forte, moyen, faible, inexistante)

# Observations réalisées

## Ruche

traitement contre varroa (type, produit, ...)

état sanitaire :

- **disparition de butineuses**
- **comportement** (impossibilité de voler, abeilles rampantes, tremblantes)
- **diarrhées**
- **modifications anatomiques** (ailes déformées, corps déformés, abdomen réduit, abeilles sans poils (luisantes))

actions entreprises par l'apiculteur (échantillons, destruction, ...)

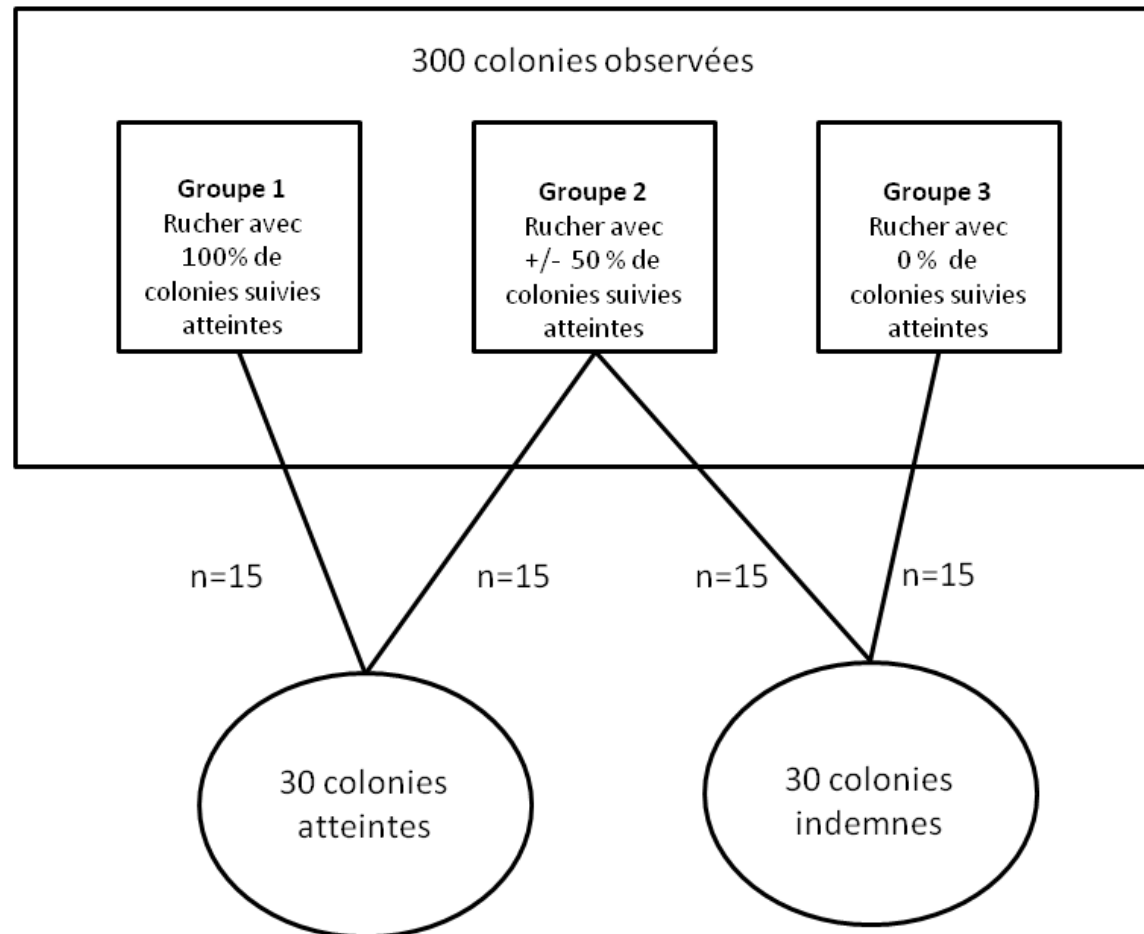


# Matrices échantillonnées

Epoque	Matrices			
	Abeilles	Pollen de trappe	Portion de cadre (pollen)	Miel
Juillet –août	200 nourrices	25g par rucher/ toutes les 2 semaines  (+ /- 6 échantillons sur 12 semaines)	100 cm <sup>2</sup>	100 cm <sup>2</sup>
Septembre – octobre	200 nourrices		100 cm <sup>2</sup>	100 cm <sup>2</sup> Cadre vide
Sortie de l'hiver	200 butineuses	-	100 cm <sup>2</sup>	100 cm <sup>2</sup>
	200 nourrices			

**+/- 2400 échantillons d'abeilles**  
**+/- 1800 échantillons de pollen de trappe**  
**+/- 1800 portions de cadre**

# Stratégie d'échantillonnage pour les analyses



**Virus ?**  
**Pesticides ?**

# Analyses virales

**Qualitatives et quantitatives (charge virale)**

**Détection moléculaire (PCR) de 5 virus** (cf. Nguyen et al. 2011 )

- **CBPV** (Chronic bee paralysis virus) - virus de la paralysie chronique
- **ABPV** (Acute bee paralysis virus) - virus de la paralysie aiguë
- **DWV** (Deformed wing virus ) - virus des ailes déformés
- **SBV** (Sacbrood virus) - virus du couvain sacciforme
- **BQCV** (Black queen-cell virus) - cellule noire de la reine

# Analyses de résidus de pesticides

## Semi-quantitatives et quantitatives

**Matrices** : pain d'abeilles, pollen de trappe, miel ,cire, abeilles

## Sélection des molécules sur base de :

- nature et son impact direct ou indirect (synergie)
- toxicité aiguë pour l'abeille ( $DL_{50}$ )
- persistance dans l'environnement ( $DT_{50}$ )
- systémicité ( $\log Pow$  )
- applications autorisées en Belgique (site Fytoweb) et exposition probable des abeilles
- chiffres de vente de la substance considérée en Belgique (chiffres SPF Santé publique)

# Analyses de résidus de pesticides

**Molécules sélectionnées** (semiquantitatif: 110/quantitatif: 43)

## **Insecticides - acaricides (47/24)**

néonicotinoïdes + métabolites (imidacloprid, clothianidine, thiamethoxam,...)

phénylpyrazoles (fipronil )

pyréthrines (cyperméthrine, deltaméthrine, fluvalinate,...)

carbamates (carbaryl, fenoxycarb,...)

organo-p (diméthoate, coumaphos,...)

## **Fongicides (46/10)**

strobilurines (azoxystrobine, trifloxystrobine,...)

triazoles (tebuconazole, propiconazole,...)

## **Herbicides (17/9)**

dérivés uréés (linuron) , de l'aniline (pendiméthaline)

hormones (2,4d, MCPA)

# Analyses de résidus de pesticides

## Sélection du laboratoire par un appel d'offre

### Critères de sélection :

- validation de la méthode d'analyse
- nombre de substances actives
- LOD et LOQ
- prix
- accréditation ou non du laboratoire (BPL, ISO 17025)

# Calendrier



## **Phase I – juin 2011 à juillet 2011**

- mise en place du réseau de ruchers
- recherche et formation des assistants
- acquisition de trappes à pollen
- réalisation des questionnaires

## **Phase II - juillet 2011 à mars 2012**

- visites des apiculteurs avec visite sanitaire des ruchers, questionnaire, distribution des trappes à pollen
- prélèvement des échantillons : abeilles, miel, pollen
- rédaction et envoi de l'appel d'offre pour l'analyse des résidus
- sélection des échantillons à analyser
- suivi ponctuel des pertes en fonction des signalements

## **Phase III – mars 2012 à janvier 2013**

- analyses des échantillons (virus et résidus de pesticides)
- interprétation des résultats , rédaction d'un rapport
- Présentation des résultats

**Fin prévue : janvier 2013**



# Remerciements

## **15 assistants apicoles**

Eric Baudoux, Frederic Coquiart, Paul De Vis, Alain Denaeyer, Benoit Dupret, Michel Gregoire, Gerard Henrotte, Eliane Keppens, Baudouin Lionnet, Michel Palumbo, François Rongvaux, Eddy Sartori, Marc Seynhaeve, Jean Luc Strebelle  
Yonel Wautier

**et aux 54 apiculteurs du projet !**