

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 25 avril 2012

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

**relatif à la prise en compte des conclusions d'une publication scientifique
dans le contexte multifactoriel de dépopulation des colonies d'abeilles**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 1^{er} septembre 2011 par la DGAI d'une demande d'avis à la suite de la publication de l'article de Vidau *et al.* relatif aux effets de l'exposition d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* à des doses sublétales de fipronil et thiaclopride : Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Viguès B., Brunet J.L., Texier C., Biron D.G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L.P., Delbac F. (2011) *Exposure to sublethal doses of Fipronil and Thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae*. Plos One, 6(6) e21550.

CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Un déclin dans la population des colonies d'abeilles est constaté depuis plus de vingt ans par les apiculteurs français. Ce constat relayé à la communauté scientifique et à l'administration a conduit à la mobilisation des autorités sanitaires et des chercheurs. L'Afssa s'est autosaisie en 2008 sur le sujet des « mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles » et a conclu, sans pouvoir confirmer l'hypothèse d'un rôle prépondérant des facteurs chimiques dans ce phénomène, sur l'existence de nombreux facteurs de stress (notamment biologiques et chimiques) dans l'environnement de l'abeille, soulevant la question d'interactions possibles entre ces facteurs. Il a été souligné la nécessité « de compléter les connaissances relatives à l'influence sur la « santé » des abeilles de l'exposition aux agents infectieux et aux produits phytopharmaceutiques, individuellement et de façon conjointe, par des méthodes standardisées » (Afssa, 2009). Des perspectives de recherche en matière de co-exposition des colonies d'abeilles à différents facteurs ont été identifiées, notamment quant aux « effets conjugués des expositions chroniques à des pesticides en présence d'infections « latentes », récurrentes, par différents pathogènes pouvant se potentialiser entre eux » (Afssa, 2009).

L'article de Vidau *et al.* (2011), publié en juin 2011, rapporte une étude réalisée chez des abeilles soumises à une infection expérimentale (au laboratoire) par l'agent de la nosérose (*Nosema*

ceranae) suivie d'un nourrissage (nourrissement)¹ par des solutions pouvant contenir du fipronil ou du thiaclopride à des doses sublétales. Les auteurs ont constaté une mortalité plus importante chez les abeilles infectées par *Nosema ceranae*, lorsqu'elles étaient exposées dans un second temps à du fipronil ou à du thiaclopride, par rapport à des abeilles infectées mais non exposées aux insecticides.

La DGAI a saisi l'Anses à la suite de la publication de Vidau *et al.* (2011), afin qu'une expertise collective détermine (1) si la publication de Vidau *et al.* apporte un nouvel éclairage scientifique sur les interactions entre facteurs potentiellement impliqués dans la mortalité des abeilles (2) si ces éléments scientifiques sont susceptibles de conduire à de nouvelles recommandations en termes de pratiques apicoles et/ou de pratiques agricoles.

L'Anses a également été saisie le 1^{er} décembre 2011 afin d'indiquer si cette publication était de nature à remettre en cause les conclusions de l'évaluation des risques pour une autorisation de mise sur le marché de la préparation SONIDO (DESIMO) à base de thiaclopride. Un avis a été rendu après expertise du CES « Produits phytopharmaceutiques » (Anses 2011-SA-0333, 2012).

ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) « Abeilles » réuni les 27 février, 5 mars et 19 mars 2012. La coordination scientifique de l'Anses a élaboré un projet d'analyse et conclusions qui a été étudié par les membres du Gecu et validé par moyens télématiques le 16 avril 2012.

L'expertise a été conduite sur la base :

- de la lettre de saisine de la DGAI en date du 1^{er} septembre 2011 ;
- de la publication scientifique, objet de l'expertise (Vidau *et al.*, 2011) ;
- de la bibliographie citée en fin d'avis.

Elle a pris en compte des éléments issus des auditions des personnalités ou organismes suivants :

- auteurs de l'article de Vidau *et al.* 2011 ;
- laboratoire communautaire de référence sur la santé de l'abeille (laboratoire Anses de Sophia-Antipolis) ;
- Ingemar Fries, Professeur, Département d'Écologie, Université des sciences agronomiques d'Uppsala (Suède) ;
- Jeffery Pettis, Professeur associé, Laboratoire de recherche sur les abeilles, Centre de recherche agronomique USDA-Beltsville, Université de Maryland (USA).

Les avis de l'Anses suivants ont également été considérés pour cette analyse :

- l'avis de l'Anses 2011-SA-0333 (relatif à la publication de l'article de Vidau *et al.* portant sur les effets d'une exposition d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride) ;
- l'avis de l'Anses-dossier 2010-1483 – DESIMO (SONIDO) (relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation DESIMO, à base de thiaclopride, de la société BAYER SAS) ;
- l'avis de l'Anses 2007-SA-0140 (Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles) (Afssa, 2009).

¹ Nourrissement est le terme consacré en apiculture pour le nourrissage des abeilles par un sirop sucré.

ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU

1. Résumé de l'article scientifique à analyser

L'expérience rapportée dans l'article de Vidau *et al.* (2011) se propose d'étudier, en conditions expérimentales, les effets sur l'abeille d'une infection par *Nosema ceranae* suivie d'une exposition à des doses sublétales d'un insecticide, le thiaclopride ou le fipronil, et d'établir une relation entre les effets observés et une modulation du système de détoxification de l'abeille par l'infection à *N. ceranae*.

Environ 2000 abeilles émergentes provenant de trois colonies Buckfast, indemnes de *Nosema ceranae* et *N. apis*, ont été utilisées. Les cadres de couvain operculé ont été placés en incubateur afin d'obtenir des abeilles naissantes constituant une population homogène d'abeilles âgées de cinq jours, qui ont été réparties en six groupes de 150 abeilles, chaque groupe comprenant trois cages de 50 abeilles chacune.

Les abeilles ont été infectées individuellement à J0 à l'aide d'une suspension comprenant 125 000 spores de *N. ceranae*, isolées à partir de broyats d'intestins d'abeilles qui avaient été préalablement infectées au laboratoire.

Les substances insecticides ont été ajoutées au sirop de saccharose fourni aux abeilles entre J10 et J20, aux concentrations de 1 µg/L pour le fipronil et de 5,1 mg/L pour le thiaclopride. La consommation journalière de sirop de saccharose a été mesurée pour chaque cage de 50 abeilles, afin de déterminer les doses moyennes d'exposition aux insecticides dans les différents groupes. Ces doses étaient de l'ordre du 1/100^{ème} de la DL₅₀ pour chacun des insecticides.

Les différents groupes d'abeilles constitués pour l'expérience sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Groupes d'abeilles et traitements dans l'expérimentation de Vidau *et al.* (2011)

Groupes expérimentaux	Infection par <i>Nosema ceranae</i> (J ₀)	Exposition aux insecticides (J ₁₀ à J ₂₀)
Témoin	-	-
Infecté (<i>N. ceranae</i>)	+	-
Fipronil	-	+
Thiaclopride	-	+
Infecté puis fipronil	+	+
Infecté puis thiaclopride	+	+

J₀ : jour de l'infection

Le succès de l'infection a été confirmé à J10 par examen microscopique et dénombrement des spores dans les broyats de tractus digestifs (le nombre moyen de spores/abeille était de $18,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$). L'espèce de *Nosema* présente a été vérifiée par PCR spécifique de *N. ceranae* (PCR duplexe *N. apis*, *N. ceranae*). L'absence de spores dans les abeilles non infectées a été vérifiée.

La consommation de sirop entre J0 et J10 par les abeilles infectées a été significativement supérieure à celle des abeilles non infectées, ce qui serait en relation avec une prise alimentaire accrue induite par le stress énergétique lié à l'infection.

Les doses d'exposition totales et journalières entre J10 et J20, estimées à partir des quantités de sirop consommées, n'étaient pas significativement différentes chez les abeilles infectées et non infectées.

La mortalité journalière a été relevée. L'exposition sub létale au fipronil ou au thiaclopride a entraîné une mortalité significativement plus élevée des abeilles infectées, alors que cette même exposition n'a pas augmenté la mortalité des abeilles non infectées (cf. tableau 2).

Tableau 2 : Mortalité cumulée dans les groupes expérimentaux de Vidau *et al.* (2011)

Groupes expérimentaux	Pourcentage de mortalité à J ₂₀
Infecté	47%
Infecté puis fipronil	82%
Infecté puis thiaclopride	71%

Des signes d'intoxication ont été observés chez les abeilles infectées puis exposées aux pesticides (agressivité, tremblements, ataxie) alors qu'aucun signe d'intoxication n'a été observé chez les abeilles non infectées mais exposées.

Les spores de *N. ceranae* ont été dénombrées dans les tractus digestifs des abeilles infectées à J20 (après 10 jours d'exposition). Les nombres de spores étaient significativement différents entre les groupes, l'exposition étant associée à un nombre de spores plus élevé ou moins élevé, selon l'insecticide utilisé (cf. tableau 3).

Tableau 3 : Résultats du dénombrement des spores de *N. ceranae* dans les abeilles infectées de l'expérimentation de Vidau *et al.* (2011)

Groupes expérimentaux	Nombre de spores dans les abeilles infectées à J ₂₀ (en million de spores par abeille)
Infecté	112,1 ± 16,7
Infecté puis fipronil	74,8 ± 12,0
Infecté puis thiaclopride	156,9 ± 13,3

Les activités enzymatiques 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase (ECOD) et glutathion-S-transférase (GST), considérées comme représentatives respectivement des phases I et II du métabolisme de détoxification, ont été mesurées à J10 dans les extraits d'intestins moyens et d'abdomens sans tractus digestif (corps gras). L'activité ECOD n'était pas significativement différente dans les extraits des groupes infectés et non infectés, alors que l'activité GST était significativement plus élevée chez les groupes infectés que chez les groupes non infectés.

Les auteurs concluent que « *cette étude confirme que les interactions entre N. ceranae et les insecticides constituent un risque significatif pour la santé des abeilles* ». Ils ajoutent que leurs « *données apportent des informations additionnelles permettant une meilleure évaluation des risques associés à ces facteurs de stress et souligne le besoin urgent de produits vétérinaires pour le traitement de la nosémose* ».

2. Informations complémentaires apportées par les auteurs de l'article

L'étude des interactions entre plusieurs facteurs implique la prise en compte de nombreuses variables susceptibles de moduler les effets observés. Les auteurs ont apporté les éléments d'éclairage suivants.

2.1. Conditions expérimentales/ méthodologie

Température

La température à laquelle est conduit un essai peut affecter les résultats de cet essai. Elle module notamment la toxicité de certaines molécules chimiques (Medrzycki *et al.*, 2011). Les auteurs de l'article ont indiqué que la plupart des toxiques mis sur le marché sont caractérisés par un coefficient de température positif, c'est-à-dire que leur toxicité augmente avec la température. Les organochlorés et les pyréthriinoïdes présentent un coefficient de température négatif, leur toxicité baisse si la température augmente, pour des températures jusqu'à 28-30 °C (température de confort de l'abeille). Au-delà, leur coefficient redevient positif. La température maintenue constante durant les essais réalisés par Vidau *et al.* a été de 33 °C (température la plus proche des conditions de vie dans la colonie).

Abeilles

Age

Le protocole expérimental de Vidau *et al.* fait mention d'abeilles âgées de cinq jours. Ce paramètre pourrait avoir une influence sur la sensibilité aux pesticides testés. Les auteurs ont précisé que les individus testés correspondent à des organismes dont la maturation est relativement aboutie et plus en cohérence avec des individus de la ruche que des abeilles émergentes. Les abeilles ont été nourries de 0 à 5 jours avec du pollen.

Espèce, race et colonie

Le protocole expérimental fait mention de colonies Buckfast (issues de croisements avec *Apis mellifera mellifera*). La sous-espèce (*Apis mellifera mellifera*) et la race (hybrides obtenus par croisements) d'abeilles utilisées pourraient avoir une influence sur la sensibilité à *Nosema ceranae* et/ou aux molécules toxiques auxquelles elles sont exposées.

La race d'abeilles utilisée dans l'essai correspond, selon les auteurs, à une race de sensibilité moyenne à *Nosema*. Ils ont par ailleurs rapporté que la variation de sensibilité des abeilles à la nosémose serait plus importante d'une colonie à l'autre que d'une race d'abeille à une autre.

Quant à la variation de sensibilité à un toxique environnemental, *Apis mellifera caucasica* est, par exemple, plus sensible à l'imidaclopride qu'*A. m. mellifera* (DL₅₀=14 ng/abeille à 24 et 48h contre 24 ng/abeille) (Suchail *et al.*, 2000). Les auteurs ont souligné que les variations inter-colonies et intra-colonies de sensibilité à l'imidaclopride sont plus importantes que les variations inter-espèces.

Les auteurs ont précisé que les abeilles ont été réparties dans les groupes expérimentaux de façon aléatoire, à partir des trois colonies initiales.

Durée de l'expérimentation en relation avec la durée de vie des abeilles

Plus l'exposition peut être prolongée, mieux il doit être possible d'objectiver des effets de toxicité chronique. Dans les essais analysés, l'exposition des abeilles aux pesticides a duré 10 jours (de J10 à J20 post infection, soit de l'âge de 15 jours à 25 jours). Les auteurs ont justifié les durées d'exposition utilisées en soulignant que le maintien des abeilles en cagettes dans les conditions du laboratoire produit un stress physiologique qui ne permet pas de prolonger l'expérimentation sans risquer de dépasser, à l'âge de 25 jours, le seuil de mortalité de 10% dans les lots témoins, seuil maximal considéré comme acceptable par les auteurs² pour la validité de l'essai.

² La Directive (91/414/CEE) EPPO PP 1/170(4) mentionne un seuil de mortalité de 15 % à ne pas dépasser sur 48 heures d'observation pour valider les essais expérimentaux.

Les auteurs ont également précisé que les abeilles utilisées étaient des abeilles « de saison », dont la durée de vie est de 20 à 40 jours (alors que les abeilles dites « d'hiver » vivent en moyenne 90 jours).

Souche de *Nosema ceranae* utilisée

Sur la question de la virulence de la souche utilisée pour l'infection expérimentale, les auteurs ont indiqué qu'il n'a pas été rapporté à ce jour de variations de virulence parmi des souches de *N. ceranae* d'origines différentes. De plus, la variabilité génétique au sein de cette espèce de microsporidies apparaît très limitée, suggérant également de faibles variations de virulence.

État sanitaire des intrants – abeilles et miel

La publication mentionne que les abeilles incluses dans les essais expérimentaux ne présentaient aucun symptôme apparent de maladie et étaient également exemptes de nosémose. Les auteurs ont précisé qu'ils ont utilisé une technique PCR permettant de détecter spécifiquement *N. ceranae* et *N. apis*³. Les auteurs ont indiqué qu'aucun agent pathogène autre que *Nosema* n'a été recherché chez les abeilles. Le pollen fourni aux abeilles pendant les cinq premiers jours de vie n'a pas été testé pour la présence d'éventuels agents infectieux.

En conclusion, les auteurs ont confirmé que de nombreuses variables peuvent affecter les résultats d'un tel essai, et que ces variables n'ont pas toutes été rapportées ou discutées dans l'article, mais ils ont souligné qu'elles s'appliquaient de la même façon à tous les groupes expérimentaux.

2.2. Résultats

Expression des résultats

Les résultats de mortalité ont été exprimés en mortalité cumulée, après dénombrement des abeilles mortes dans l'ensemble des trois cages de 50 abeilles constituant un groupe expérimental. En raison du mode d'expression choisi pour la mortalité, il n'est pas rapporté de moyenne de mortalité par groupe de trois cages, ni d'écarts-types indiquant la variabilité intra-groupe (effet cage). Les auteurs ont cependant indiqué que la mortalité observée a varié de 15 % autour de la moyenne pour chaque groupe. Ils ont fourni au Gecu des résultats bruts (mortalité par cage pendant l'infection).

Reproductibilité

Bien que l'article lui-même ne comporte pas d'indication sur la reproductibilité, les auteurs ont précisé que l'étude avait été effectuée trois fois avec, pour chaque essai, des résultats convergents. Dans la publication, ne sont rapportés que les résultats de la troisième étude.

3. Bilan des connaissances scientifiques disponibles

Un bref état des lieux des connaissances sur la nosémose, d'une part, et sur la toxicologie des insecticides chez l'abeille, d'autre part, a été réalisé par le Gecu afin d'appuyer son argumentaire.

³ Les références de la technique utilisée (Martin-Hernandez *et al.*, 2007 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2010), non indiquées dans la publication (qui réfère à une autre technique) ont été fournies au Gecu par Vidau *et al.*

3.1. Nosébose des abeilles à *N. ceranae*

Une fiche-résumé sur la nosébose des abeilles est présentée en annexe de cet avis (cf. annexe 1) et quelques éclairages supplémentaires sont fournis ci-dessous concernant les connaissances et actuelles incertitudes liées à la nosébose :

- La température et répartition géographique : Higes *et al.* (2010), en appui avec d'autres études publiées auparavant sur le sujet, suggèrent que *N. ceranae* est eurytherme (qui tolère un éventail large de températures) alors que *N. apis* est sténotherme (qui tolère un éventail restreint de températures). La répartition géographique de la microsporidie *N. ceranae* en Europe, selon un gradient nord-sud (présence accrue vers le sud), pourrait refléter une perte de viabilité des spores aux basses températures.
- Les déterminants de la virulence et de la pathogénicité de ce parasite sont inconnus. A ce jour, l'existence de différentes lignées/souches de *N. ceranae* n'est pas documentée dans la littérature scientifique.
- Les facteurs de réceptivité et de sensibilité de l'abeille restent encore très peu connus. Ils pourraient comprendre des facteurs d'ordre génétique. Il semble d'ailleurs que les sélections réalisées (empiriquement) par les apiculteurs depuis quinze ans aient permis d'augmenter la résistance globale des abeilles à *Nosema* (l. Fries, communication personnelle). Chez le bourdon (*Bombus terrestris*), la variabilité génétique et le sexe des individus ainsi que la densité des colonies jouent un rôle sur les niveaux d'infection par *N. bombis* (Huth-Schwarz *et al.*, 2012). Selon cette étude, les mâles et les ouvrières dont la diversité génétique est plus faible montrent des niveaux d'infection plus élevés que la moyenne. De même, les colonies à plus forte densité comportent également des niveaux d'infection plus élevés.
- L'âge des abeilles : aucune variation de sensibilité à *Nosema ceranae* liée à l'âge des abeilles n'a été rapportée à ce jour, mais un nombre de spores plus important est généralement retrouvé chez les abeilles plus âgées (en âge de butiner) par rapport aux jeunes abeilles (Higes *et al.*, 2008 ; Meana *et al.*, 2010 ; Smart et Sheppard, 2012).
- La relation hôte-parasite :
 - Les doses infectantes :
Des doses de l'ordre de 10^5 spores par abeille se sont révélées infectantes (Vidau *et al.*, 2011 ; Pettis *et al.*, 2012).
D'après les experts, l'ingestion de quelques spores au sein d'un organisme non carencé et à une température adéquate peut aboutir à une intense prolifération et suffirait à établir l'infection. Il a été fait mention d'une notion de dose-seuil de spores viables, en dessous de laquelle l'infection ne se développe pas, et au-dessus de laquelle elle se développe dans l'intestin de l'abeille quelle que soit cette dose.
 - La relation dose/effet :
Relation entre dose infectante et charge parasitaire dans le tractus digestif de l'abeille :
Il ne semble pas exister de relation quantitative; quelle que soit la dose infectante, si l'infection se développe, le nombre de spores présentes dans l'intestin de l'abeille infectée apparaît surtout dépendant de la durée d'évolution de l'infection (Forsgren et Fries, 2010). Ainsi pour Pettis *et al.* (2012) l'utilisation de différentes doses infectantes ($0,1 \times 10^6$ spores/mL ou 1×10^6 spores/mL) n'a pas entraîné de différence significative dans le nombre total de spores de *Nosema* dénombré dans l'intestin des abeilles.

Relation entre charge parasitaire, telle que mesurée par le dénombrement des spores dans l'intestin, et la sévérité de la maladie, au plan individuel et au niveau de la colonie :

Au niveau individuel, il n'existe pas de relation claire entre le nombre de spores dans l'intestin et la sévérité des symptômes associés à la nosébose. L'impact sanitaire individuel produit par une infection à *N. ceranae* ne semble proportionnel ni à la dose infectante, ni même à la charge parasitaire établie dans l'intestin. Pour une colonie donnée, il semble que le niveau d'infection ou taux de prévalence de *Nosema ceranae* dans la population des abeilles nourricières constitue un indicateur important de la gravité de l'infection (Higes *et al.*, 2008 ; Higes *et al.*, 2009). Au-delà d'un seuil qui se situerait autour de 10% de prévalence, la colonie s'affaiblit puis meurt. Cette observation est à mettre en parallèle avec le processus d'infection des colonies par *N. ceranae*. Lorsque les seules abeilles butineuses (abeilles d'extérieur) sont atteintes, la pression d'infection dans la colonie est modérée car ces abeilles évacuent leurs spores lors du vol de propreté à l'extérieur de la colonie. Cette pression augmente considérablement lorsque les abeilles nourricières (abeilles d'intérieur) sont atteintes, celles-ci expulsant les spores de *N. ceranae* (fèces) à l'intérieur même de la ruche.

Relation entre dose infectante et mortalité :

Dans leur étude, Martin-Hernandez *et al.* (2011) ont mis en évidence une corrélation entre des doses croissantes d'infection par *N. apis* et les niveaux de mortalité relevés ; la même corrélation a été documentée avec *N. ceranae*, mais avec des niveaux de mortalité plus élevés. Ce constat fait la preuve pour ces auteurs d'une relation dose infectante-effet final (mortalité).

3.2. Toxicocinétique des insecticides chez les abeilles

La plupart des tests de détermination de valeurs de références de toxicité aiguë d'une molécule chimique se déroulent sur une durée de 48 heures (durée d'observation) après une exposition unique (cf. annexe 4).

La métabolisation d'une molécule chimique peut être à l'origine :

- d'une augmentation de la toxicité par la production de métabolites plus toxiques que la molécule parente ;
- d'un effet cumulatif.

Certaines données de toxicocinétique sont disponibles pour l'imidaclopride. La demi-vie de cette molécule pour l'abeille entière est d'environ cinq heures (Suchail *et al.*, 2004). L'imidaclopride est métabolisé en six métabolites (le 4/5-hydroxy-imidaclopride, l'oléfine, l'acide 6-chloronicotinique, le 4,5-dihydroxy-imidaclopride et les dérivés urée et guanidine) par les enzymes de la phase I. Deux de ces métabolites : le 5-hydroxy-imidaclopride et l'oléfine sont caractérisés par une toxicité élevée (Suchail *et al.*, 2000 ; 2001). L'acide 6 chloronicotinique et les dérivés urée sont les principaux métabolites, majoritairement retrouvés dans l'intestin moyen et le rectum de l'abeille. Le 4/5-hydroxy-imadaclopride et l'oléfine sont retrouvés préférentiellement dans la tête, le thorax et l'abdomen (Suchail *et al.*, 2004).

Pour le fipronil et thiaclopride, les données correspondantes chez l'abeille font défaut.

Des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des molécules testées permettraient de mieux comprendre l'évolution de leur toxicité dans le temps et les interactions avec la nosébose, ainsi que les différences observées selon la nature du toxique, entre l'imidaclopride (Alaux *et al.*, 2010), le fipronil et le thiaclopride (Vidau *et al.*, 2011).

3.3. Induction du processus de métabolisation chez l'abeille

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les capacités de détoxification sont altérées chez les abeilles infectées par *N. ceranae*, les auteurs ont suivi des activités enzymatiques associées à la métabolisation des produits. Le processus de métabolisation fait intervenir différentes enzymes :

- Les enzymes de phase I catalysent des réactions chimiques d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse de la molécule-parente (par rupture de la liaison ester) ou de suppression de radicaux. Elles sont représentées majoritairement par des enzymes appartenant à la superfamille des cytochromes P-450 (CYP), dont un exemple est l'activité enzymatique ECOD⁴.
- Les enzymes de phase II catalysent des réactions de conjugaison des substances parentes ou des métabolites produits par les enzymes de phase I. Il s'agit principalement des transférases, représentées majoritairement par les glucuronyltransférases, glutathion-S-transférases (GST), les acétyltransférases et méthyltransférases.

Les réactions de phase II favorisent l'excrétion du composé produit dans l'urine ou les fèces (Williams, 1959 ; Dorne, 2010).

En outre, des protéines membranaires de transport participent également à l'absorption et l'élimination de composés toxiques et sont majoritairement représentées par les P-glycoprotéines (P-gp). Ces éléments membranaires agissent de concert avec les enzymes de la phase I (Hawthorne et Dively, 2011).

Certains composés issus de la phase I de métabolisation peuvent avoir une toxicité accrue comparée à celle de la molécule parente. La compréhension des réactions chimiques catabolisées par les CYP semble donc essentielle pour l'évaluation de la toxicité des pesticides dans l'organisme des abeilles (Mao *et al.*, 2011).

La métabolisation a des conséquences majeures pour la caractérisation du danger car les enzymes de phase I ou de phase II peuvent à la fois générer des métabolites toxiques ou détoxifier un composé parent toxique. Pour la plupart des insectes, bénéfiques ou ravageurs, les réactions métabolisées par les CYP sont centrales, tant pour la détoxification que pour la toxification des composés chimiques, et déterminent la tolérance ou l'évolution de résistance à des pesticides, comme la tolérance aux insecticides de la famille des pyréthrinoides pour les abeilles domestiques (Mao *et al.*, 2011).

L'abeille se distingue sur ce plan des autres insectes (*cf.* annexe 5) :

- elle ne possède que la moitié des gènes codant pour des enzymes de métabolisation par rapport aux autres hyménoptères, et pourrait donc présenter une sensibilité accrue aux molécules chimiques toxiques de son environnement (vanEngelsdorp *et al.*, 2010). Ce point est cependant sujet à discussions. Pour certains auteurs, le déficit en gènes codant pour les enzymes du système de métabolisation, ne se traduit pas forcément par de moindres capacités de détoxification, et ne serait pas à l'origine d'une sensibilité accrue aux insecticides (Hardstone et Scott, 2010) alors qu'il indique pour d'autres une moindre résistance dans un environnement toxique (Atkins *et al.*, 1992 ; vanEngelsdorp *et al.*, 2010).
- L'induction de l'expression des gènes de métabolisation chez l'abeille semble affectée par les qualités nutritionnelles de son alimentation (*cf.* annexe 5). Les aliments de la ruche (pollen, pain d'abeille, miel) seraient à l'origine d'une meilleure induction que celle obtenue par une alimentation à base de sirop sucré (Johnson *et al.*, 2012).

4. Discussion du Gecu « Abeilles » sur l'article de Vidau *et al.* (2011)

4.1. Protocole expérimental choisi pour mettre en évidence des interactions entre facteurs toxiques et infectieux

Les changements physiologiques induits chez les insectes par la plupart des agents pathogènes (insectes, acariens, champignons, bactéries, virus) peuvent se traduire par une sensibilité accrue de l'insecte à d'autres stress environnementaux, naturels ou anthropiques (Ratnieks et Carreck, 2010). Inversement, l'exposition des insectes à des facteurs toxiques pourrait les rendre plus

⁴ ECOD : 7-ethoxycoumarin-O-deethylase

réceptifs et/ou plus sensibles à des agents pathogènes (Holmstrup *et al.*, 2010). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas nécessairement les mêmes dans les deux situations. Il est donc intéressant de considérer, pour l'étude de ces interactions, l'une ou l'autre de ces possibilités. L'essai de Vidau *et al.*, qui comprend une infection par *N. ceranae* suivie d'une exposition à des insecticides, se propose d'explorer le premier type d'interactions.

Par ailleurs, ces interactions peuvent être étudiées au laboratoire, à l'échelon individuel (cas de l'essai analysé ici), ou en conditions naturelles, à l'échelle de la colonie.

Comparaison du protocole de l'étude par Vidau *et al.* (2011) avec les autres travaux récents sur le même thème

Différents articles sur le sujet des interactions entre nosémose et insecticides ont été publiés récemment, et diffèrent par les conditions (expérimentales ou naturelles) dans lesquelles sont menés les essais, ainsi que par la séquence d'application des événements stressants.

i. Essais au laboratoire (en cages, ou « cagettes »)

Alaux *et al.* (2010) ont étudié une interaction entre une infection par *Nosema ceranae* et une exposition à un insecticide (imidaclopride), intervenant de façon simultanée. Elle s'est traduite par une mortalité plus élevée chez les abeilles infectées et exposées, ainsi que par une augmentation de l'activité de la glucose-oxydase (Le peroxyde d'hydrogène est le résultat de l'oxydation du glucose par la glucose-oxydase. Il s'agit d'un puissant antiseptique utilisé pour le maintien du niveau sanitaire de la ruche). Dans cette expérience, le stress énergétique causé par le parasitisme s'est traduit par une augmentation de la consommation de sirop contaminé, exposant ainsi les abeilles infectées à une dose toxique supérieure (par rapport aux abeilles non infectées). Dans l'étude d'Alaux *et al.* (2010), la mortalité plus élevée chez les abeilles infectées peut être rapportée à ces doses d'exposition plus fortes.

Aufavre *et al.* (2012) ont publié très récemment un essai dans des conditions proches de celles utilisées par Vidau *et al.* (2011). Ces travaux rapportent les effets comparés en termes de mortalité cumulée de différentes séquences d'intervention des facteurs toxiques et infectieux. Sept combinaisons / séquences d'infection / exposition ont été testées. Chaque combinaison a donné lieu à un effet synergique sur la mortalité des abeilles (effet supérieur à la somme des effets de chaque facteur).

ii. Essais réalisés en partie en milieu naturel

Pettis *et al.* (2012) ont exposé trente colonies d'abeilles à des doses sublétales d'imidaclopride pendant 10 semaines. Après cinq à huit semaines d'exposition (c'est-à-dire 1,5 et 2,5 générations exposées), des cadres de couvains (abeilles émergentes) de colonies sélectionnées ont été prélevés et apportés au laboratoire. Des abeilles émergentes adultes en ont été extraites, puis pesées (afin de déterminer le poids moyen des abeilles émergentes issues de plusieurs générations exposées) ou nourries en cage avec une suspension contenant des spores de *N. apis* et *N. ceranae* durant les deux premiers jours de leur vie adulte. Ils ont mis en évidence une relation entre l'exposition des colonies et la quantité de spores de *Nosema* chez les individus infectés.

Wu *et al.* (2012) suggèrent qu'une exposition du couvain aux pesticides (auxquels les colonies sont usuellement exposées) conduit à la production d'abeilles adultes plus sensibles au parasite *Nosema ceranae*.

vanEngelsdorp *et al.* ont échantillonné durant les mois de janvier et février 2007, 91 colonies appartenant à 13 ruchers de Californie ou de Floride pour leurs abeilles adultes, le couvain, la cire et le pain d'abeille. Plus de 200 variables ont été investiguées afin de déterminer celles qui apparaissaient à une fréquence suffisante pour être reliée au phénomène de CCD (colony collapse disorder) (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). L'étude de 2010 correspond à la réalisation d'un algorithme de CART (Classification and regression tree) pour l'identification des variables qui indépendamment ou en combinaison discriminent mieux les colonies en CCD ou non (vanEngelsdorp *et al.*, 2010).

Il est remarquable que l'ensemble des essais réalisés (dont les travaux rapportés par Vidau *et al.*, 2011) convergent vers des résultats cohérents qui suggèrent des interactions défavorables pour l'abeille entre facteurs toxiques à faibles doses et l'infection par *Nosema*. La très récente publication d'Aufauvre *et al.* (2012) qui a exploré et comparé en situation expérimentale les effets de différentes séquences d'intervention de ces facteurs, confirme ces interactions quelle que soit la séquence des événements stressants.

Mise en évidence d'une synergie entre facteurs de stress

Les auteurs de la publication soumise pour analyse indiquent des « effets synergiques » de l'exposition aux insecticides à des doses sublétales et de l'infection à *N. ceranae*. Une synergie existe entre différents facteurs lorsque les effets observés par la combinaison de ces facteurs sont supérieurs à la somme des effets produits séparément par chacun des facteurs. Dans l'article de Vidau *et al.* (2011), alors que la courbe de mortalité des abeilles soumises aux différents traitements (insecticides et pathogène) indique qu'un tel phénomène pourrait se produire, son degré de significativité statistique n'a pas été mesuré. En revanche, la publication ultérieure par la même équipe (Aufauvre *et al.*, 2012) adresse ce point par un protocole approprié et met en évidence de tels effets.

4.2. Conditions expérimentales utilisées

Origine des abeilles

Le Gecu a regretté que l'effet colonie, dont l'importance a été soulignée précédemment, n'ait pas pu être testé dans l'essai rapporté par Vidau *et al.* (2011).

Agents pathogènes intercurrents chez les abeilles ou présents dans le pollen

Les colonies dont étaient issues les abeilles utilisées n'ont pas été testées au regard de la présence d'agents pathogènes, comme dans la plupart des publications sur cette thématique. Les individus de début (abeilles émergentes) et de fin d'expérimentation (abeilles sacrifiées pour comptage des spores) n'ont pas non plus été contrôlés au regard d'agents infectieux autres que *Nosema*, notamment des virus. De même il ne peut pas être exclu que le pollen fourni durant les cinq premiers jours de l'expérimentation ait pu être contaminé par des agents infectieux (dont *Nosema*). Le Gecu a rappelé que, pour toute infection expérimentale, quelle que soit l'espèce animale considérée, il est indispensable de s'assurer que les animaux admis dans l'expérience sont indemnes de toute pathologie intercurrente susceptible d'introduire des biais d'analyse et d'interprétation.

Doses d'exposition aux insecticides

L'avis de l'Anses 2011-SA-0333 a fait état de divergences d'interprétation, entre les auteurs de l'article et les experts du CES « Produits phytopharmaceutiques », sur la question des doses d'insecticides auxquelles les abeilles étaient exposées dans l'essai qui est rapporté.

L'avis 2011-SA-0333 indique : « la dose subléthale a été choisie à partir des DL_{50} de chaque insecticide et l'exposition réelle confirmée par la mesure quotidienne de la consommation de sirop contaminé.[...]

Pour le fipronil, l'exposition journalière moyenne correspond à la $DL_{50}/158$ chez les abeilles non infectées ($25,3 \pm 4,8$ pg/abeille) et à la $DL_{50}/148$ chez les abeilles infectées ($26,9 \pm 0,8$ pg/abeille).

Pour le thiaclopride, l'exposition journalière moyenne correspond à la $DL_{50}/151$ chez les abeilles non infectées ($112,1 \pm 4,4$ ng/abeille) et à la $DL_{50}/112$ chez les abeilles infectées ($152,8 \pm 8,7$ ng/abeille).

Comme il n'est pas précisé si les concentrations en insecticides ont été vérifiées dans les sirops contaminés, les expositions estimées sont considérées comme des doses nominales même si la consommation de sirop a été prise en compte. Selon les auteurs, les consommations totales et les consommations journalières des abeilles non infectées et des abeilles infectées ne sont pas significativement différentes. Si cela semble être le cas pour le fipronil, les incertitudes données pour le thiaclopride semblent indiquer une différence sensible, les abeilles infectées consommant davantage de sirop contenant du thiaclopride que les abeilles non infectées ».

Il doit être noté, et ce point sera discuté ultérieurement (cf. 5.1 « Éclairage apporté par la publication de Vidau et al. sur les interactions entre facteurs potentiellement impliqués dans la mortalité des abeilles », paragraphe « Pertinence des résultats obtenus en conditions expérimentales ») que la dose de thiaclopride à laquelle ont été exposées les abeilles de cette étude, qui est de l'ordre du 1/100^{ème} de la DL₅₀, n'apparaît pas représentative d'une exposition en milieu naturel. Selon l'avis de l'Anses 2011-SA-0333, cette dose expérimentale serait de 9000 à 13 000 fois supérieure à celle à laquelle seraient exposées des abeilles dans des conditions naturelles via le pollen d'un maïs obtenu à partir de semences traitées par le thiaclopride sous la forme SONIDO^(ND) (DESIMO). La comparaison des doses d'exposition dans les deux cas est cependant délicate car le sirop de sucrose utilisé par Vidau et al., constitue une matrice différente de celle étudiée pour l'évaluation du produit DESIMO (pollen).

Pour le fipronil, la dose d'exposition utilisée dans l'étude de Vidau et al. est difficilement comparable à une exposition réelle en conditions de terrain. Aucun produit formulé à base de fipronil n'étant actuellement autorisé sur le marché (cf. annexe 3).

Il apparaît également utile de rappeler ici que les doses utilisées dans les essais en laboratoire sont initialement établies pour permettre la mise en évidence de phénomènes grâce à des paramètres aisément mesurables et dont les variations sont attendues comme significatives malgré les effectifs limités. Ce sont également les conditions qui doivent permettre d'étudier les mécanismes responsables de ces phénomènes. A un stade ultérieur, il serait important de passer à l'étude des relations doses-effets, permettant notamment de mesurer les effets à des doses comparables auxquelles sont exposées les abeilles dans leur milieu naturel.

Durée d'exposition aux insecticides

Afin de mettre en évidence des effets de toxicité chronique, ainsi que des interactions entre différents facteurs supposés intervenir également sur un mode chronique, il serait intéressant de proposer des protocoles d'exposition prolongés. La durée de l'expérimentation de Vidau et al. (2011) est de 10 jours. Elle est limitée par la contrainte du maintien en vie des abeilles en captivité (dans des cages). Le Gecu a suggéré l'utilisation d'abeilles « d'hiver » qui vivent beaucoup plus longtemps que les abeilles de saison (jusqu'à 190 jours contre 20 à 40 jours) en complément d'étude avec des abeilles « d'été », qui comportent une physiologie différente des abeilles « d'hiver », testées sur des périodes plus courtes de 10 jours environ. Toutefois, il peut être moins pertinent de rechercher des effets de toxicité chez des abeilles qui dans la nature sont moins exposées aux pesticides (en raison d'une application saisonnière de ces derniers). Aufauvre et al. (2012) ont confirmé l'importance de la durée de l'exposition ainsi que de possibles facteurs de sensibilité liés à l'âge. En effet, dans les essais qu'ils rapportent, les abeilles exposées dès l'émergence ont été les plus touchées par chacun des facteurs, infectieux ou toxiques, pris séparément. Dans les séquences infection-exposition, les abeilles infectées dès l'émergence ont été les plus touchées, quelle que soit la période d'exposition au fipronil (à l'émergence J0, ou à J7).

4.3. Paramètres mesurés et autres aspects méthodologiques

Dénombrement des spores comme mesure de la charge parasitaire

Si la méthode utilisée pour le relargage et le dénombrement des spores à partir des tractus digestifs d'abeilles est relativement standardisée, elle ne présente pas le degré de précision d'une PCR quantitative. Les experts s'accordent cependant pour la trouver suffisante et adaptée à la mesure de la charge infectieuse dans le tractus digestif des abeilles.

Un biais important de cette mesure a cependant été évoqué par des spécialistes de la nosérose. Il est lié au fait que les spores de *Nosema* sont évacuées par l'abeille dans son environnement, au cours de la défécation. Une excrétion répétée de spores par les abeilles infectées réduirait artificiellement la charge parasitaire mesurée à partir des tractus digestifs.

Mesure des activités enzymatiques liées à la détoxification

L'hypothèse émise par les auteurs est que l'infection par *N. ceranae* pourrait être à l'origine d'une modification des capacités de métabolisation. Elle s'appuie sur le fait que *Nosema* est parasite intracellulaire des cellules épithéliales intestinales, alors que les processus de détoxification ont précisément lieu dans l'intestin de l'abeille. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont, de façon

pertinente, mesuré l'activité des enzymes ECOD et GST, respectivement considérées comme reflétant l'efficacité des phases I et II de la détoxification (cf. 3.3).

Éléments statistiques

Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison de la consommation de sirop sucré et l'activité enzymatique de métabolisation, au 10ème jour après l'infection, entre le groupe infecté par *N. ceranae* et le groupe témoin. L'effet de l'exposition aux insecticides sur la production de spores de *N. ceranae* a été évalué à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis.

La consommation du sirop sucré et d'insecticides ayant été évaluée, respectivement, durant les 10 et 20 premiers jours après l'infection, d'autres tests statistiques auraient pu être mis en œuvre, tel que, par exemple, une analyse de la variance (ANOVA) à deux dimensions (une indépendante et l'autre dépendante) pour mesures répétées. Cette méthode permet, après vérification des conditions de validité, de tester la différence entre groupes indépendants, le changement au cours des mesures et l'interaction entre les groupes et les répétitions.

Le nombre de spores de *N. ceranae* étant une variable de comptage, l'usage d'un modèle linéaire généralisé, telle qu'une régression de Poisson (ou d'une régression binomiale négative en cas de variabilité extra-binomiale constatée) aurait été adapté. Un tel modèle permet en effet la prise en compte de plusieurs variables explicatives indépendantes.

4.4. Résultats et discussion

Mortalité

La publication de Vidau *et al.* rapporte une différence significative de mortalité entre les abeilles infectées et les abeilles infectées puis exposées. L'étendue de la variabilité intra-groupes a été précisée par les auteurs. Cet effet sur les mortalités est le seul effet univoque observé dans cet essai.

Charge parasitaire – corrélation avec les mortalités

Des effets opposés ont été relevés selon la molécule toxique considérée. Dans le cas du fipronil, une diminution du nombre de spores dans les épithéliums intestinaux a été notée ; dans le cas du thiaclopride, une augmentation du nombre de spores a été constatée. Au final les charges parasitaires dans les différents groupes ne présentent pas une bonne corrélation avec les résultats de mortalité. Une explication possible serait que l'exposition des abeilles aux insecticides ait un effet sur le transit digestif, augmentant ou diminuant la fréquence d'émission de fèces, et ce faisant, la vidange plus ou moins importante des spores stockées dans l'ampoule rectale. Ce phénomène pourrait notamment expliquer les résultats du dénombrement des spores présentés en figure 4 de la publication.

Les résultats de Vidau *et al.* indiquent ainsi que le dénombrement de spores dans les intestins des abeilles pourrait ne pas être un bon indicateur de la sévérité de l'infection,

- soit qu'il ne constitue pas une bonne mesure de la charge parasitaire, pour des raisons techniques ou liées à la physiologie de l'abeille,
- soit que la charge parasitaire ne soit pas le facteur déterminant des mortalités.

Activités enzymatiques (cf. annexe 5)

Les auteurs ont montré que les GST étaient induites par l'exposition au fipronil et au thiaclopride, mais pas l'activité ECOD. Ce résultat doit être considéré avec prudence car l'abeille présente un profil CYP très particulier : l'activité ECOD, chez l'abeille, pourrait ne pas être induite ou réprimée par les mêmes facteurs ou conditions que chez les autres organismes. Ainsi, Mao *et al.* (2011) ont montré que la phénytoïne, un inducteur de CYP chez les vertébrés et les invertébrés (Guirguis et Brindley, 1976), n'induit pas les CYP chez l'abeille.

Johnson *et al.* (2012) ont par ailleurs mis en évidence que la quercétine⁵, présente dans le régime alimentaire naturel de l'abeille (aliments de la ruche : pollen, pain d'abeille, miel), induit les CYP spécifiques, présents chez l'abeille, comme les isoformes de la sous famille CYP6AS. Le

⁵ La quercétine est un flavonoïde de type flavonol.

nourrissage d'abeilles par un sirop sucré, tel que prévu, par exemple, dans les protocoles expérimentaux en laboratoire, pourrait être à l'origine d'une absence d'induction de la métabolisation, contrairement à l'alimentation naturelle de l'abeille. Les capacités de métabolisation de l'abeille en seraient donc amoindries. Une autre interprétation possible est que le fipronil et le thiaclopride pourraient avoir un effet inhibiteur de la synthèse des CYP chez l'abeille, ce qui modifierait le processus de métabolisation de ces molécules (Joo *et al.*, 2007).

5. Conclusions du Gecu

5.1 Éclairage apporté par la publication de Vidau *et al.* (2011) sur les interactions entre facteurs potentiellement impliqués dans la mortalité des abeilles

Intérêts et limites de l'article

Le constat issu de ces travaux, d'une augmentation de la mortalité chez des abeilles soumises à une infection par *N. ceranae* puis exposées à un insecticide (fipronil ou thiaclopride), apparaît valide. Cette conclusion est consolidée par un faisceau de résultats convergents issus d'autres essais récents réalisés en conditions de laboratoire ou naturelles (Alaux *et al.*, 2010 ; Aufauvre *et al.*, 2012 ; Pettis *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2012).

L'article de Vidau *et al.* (2011) montre que l'exposition sub létale au fipronil ou au thiaclopride a entraîné une mortalité significativement plus élevée des abeilles infectées. Cette même exposition n'ayant pas augmenté la mortalité des abeilles non infectées, la « synergie », *sensu stricto* entre facteurs toxiques et infectieux, n'a pu être démontrée dans le présent article. Cette démonstration est réalisée par une publication ultérieure du même groupe (Aufauvre *et al.* 2012).

Certains mécanismes qui sous-tendent l'augmentation de mortalité observée ont été étudiés sans qu'un résultat significatif n'ait pu être obtenu. L'investigation de l'altération des processus de détoxification chez les abeilles infectées par *N. ceranae* n'a pas donné lieu à des résultats univoques, ni celle de l'exposition aux pesticides favorisant la multiplication du parasite dans le tractus digestif de l'abeille. L'article d'Aufauvre *et al.*, (2012) qui met en évidence des effets similaires quelle que soit la séquence d'exposition / infection, pose des questions importantes en termes de mécanismes. Ces résultats suggèrent qu'à la fois les mécanismes de détoxification pourraient être altérés par l'infection à *Nosema*, et des mécanismes de l'immunité protectrice pourraient être perturbés par les pesticides.

Intérêt des études en conditions de laboratoire

Les conditions contrôlées applicables aux essais menés en laboratoire permettent d'assurer une meilleure reproductibilité par rapport à des essais de terrain dans lesquels de nombreux paramètres sont susceptibles de varier de façon simultanée.

Le nombre d'échantillons et de répétitions à tester dans des essais en laboratoire ne représente pas un facteur limitant pour l'analyse statistique ultérieure.

La compréhension des effets des facteurs de stress sur l'individu abeille, ainsi que celle des mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires responsables de tels effets, passent nécessairement par ces investigations de laboratoire.

Pertinence des résultats obtenus en conditions expérimentales

La pertinence environnementale des essais réalisés au laboratoire est discutable. Les effets de facteurs de stress sur l'abeille en tant qu'individu, dans des conditions très particulières (cagettes) qui sont en elles-mêmes génératrices de stress, ne peuvent pas être directement extrapolés à une colonie d'abeilles dans son milieu naturel. Seuls des essais complémentaires, sous tunnels ou en champs, peuvent permettre d'objectiver ces effets à l'échelle du super-organisme qu'est la colonie.

Il est rappelé également (cf. 4.2 conditions expérimentales) que les doses de pesticides, notamment le thiaclopride, auxquelles étaient exposées les abeilles dans la publication soumise pour analyse, tout en étant très inférieures à la dose létale, étaient néanmoins très supérieures aux doses auxquelles les abeilles sont exposées dans la nature. Ainsi, les doses utilisées en situation expérimentale, si elles sont pertinentes au regard des objectifs visés (confirmer des effets,

décrypter les mécanismes responsables de ces effets), ne le sont pas nécessairement au regard de la situation naturelle.

En conclusion, les essais au laboratoire constituent un premier niveau d'expérimentation permettant d'objectiver au niveau individuel un phénomène suspecté au plan populationnel dans la nature, ainsi que d'explorer les mécanismes en cause. Ils ont cependant une signification environnementale limitée. Dans un deuxième temps, des protocoles expérimentaux plus représentatifs du milieu naturel, tels que les essais sous tunnels ou les essais en plein champ peuvent être mis en œuvre. Les essais en plein champ permettent d'observer de manière globale des effets au niveau de la colonie entière et des différences entre catégories d'abeilles. Néanmoins, bien que les conditions de plein champ soient les plus proches des conditions naturelles dans lesquelles évoluent les colonies d'abeilles, avec notamment des doses d'exposition et des taux d'infection plus réalistes, elles sont aussi plus difficiles à contrôler ce qui peut entraîner des erreurs d'interprétation (c'est-à-dire des faux-négatifs). En outre, le nombre d'échantillons et de répétitions à tester représente un facteur limitant pour l'analyse statistique du fait de la variabilité intra et inter-colonies et de la complexité des interactions au sein de la colonie (c'est-à-dire les phénomènes de compensation modifiant les niveaux de population au sein des différentes catégories d'abeilles comme dans le cas des nourrices devenant plus précocement butineuses pour compenser les pertes de butineuses).

5.2. Recommandations

5.2.1 Gestion sanitaire des ruchers

En raison du caractère multifactoriel des affaiblissements des populations d'abeilles, une bonne gestion sanitaire des ruchers constitue la base de la lutte contre ce phénomène.

Il est probable que *Nosema ceranae* est actuellement présent en France dans une forte proportion de colonies, mais à un niveau d'infection faible (peu/pas d'abeilles nourricières infectées dans la colonie) et généralement sans expression clinique.

Contre la nosérose, les auteurs rappellent qu'aucun traitement disposant d'une AMM⁶ n'est disponible en France. Cependant, des actions préventives efficaces peuvent être entreprises par les apiculteurs :

- le changement régulier des cadres des ruches,
- le changement des cadres avant chaque hivernage,
- le nettoyage et la désinfection du matériel d'élevage,
- la localisation du rucher dans un lieu sec, bénéficiant d'une forte luminosité, de peu de vent, et à proximité de sources alimentaires de qualité. Indépendamment du niveau sanitaire de rucher, sa localisation apparaît comme un paramètre déterminant pour le développement du parasite au sein des colonies.

5.2.2. Évaluation des risques liés aux produits phytopharmaceutiques et évolution des protocoles d'évaluation

La réduction du risque lié aux pesticides passe par une meilleure évaluation du danger et par une limitation de l'exposition.

Le système d'évaluation des produits phytopharmaceutiques a jusqu'à présent permis d'éviter les accidents liés à des intoxications aiguës mais paraît moins adapté à la mise en évidence d'éventuels effets sublétaux liés à des intoxications chroniques.

L'évaluation du risque des pesticides pour l'abeille et les autres pollinisateurs résulte aujourd'hui des dispositions de la Directive communautaire 91/414 et ses modifications (Rivière, 2006), remplacée depuis juin 2011 par le Règlement 1107/2009. De nouvelles exigences en termes d'essais sont en discussion (cf. tableau 1, éléments soulignés de la colonne « Projets d'annexes »). Les outils expérimentaux correspondent actuellement à des essais d'écotoxicité de laboratoire, des

⁶ AMM : autorisation de mise sur le marché.

essais en conditions semi-naturelles et des essais en plein champ. Pour l'essentiel, les essais de laboratoire déterminent la réponse des organismes à des doses croissantes de produit (toxicité aiguë). La toxicité peut alors être quantifiée par plusieurs valeurs (CE_{50} , concentration induisant 50% d'effet ; DL_{50} , idem si cet effet est une mortalité ; LOEC, plus faible concentration expérimentale entraînant un effet statistiquement différent de celui observé chez le témoin ; NOEC, plus forte concentration expérimentale n'entraînant pas d'effet statistiquement différent de celui observé chez le témoin⁷).

La procédure d'évaluation est progressive. Dans un premier temps les données de toxicité aiguës obtenues en conditions de laboratoire (DL_{50} orale et contact) sont comparées à la dose par hectare pour calculer un quotient de risque (HQ^8) (= dose [g par hectare] / DL_{50} [μ g/abeille]). Si celui-ci est inférieur à 50, l'évaluation s'arrête, le risque pour les abeilles étant considéré comme acceptable. Si ce quotient est supérieur à 50, alors des essais en conditions plus « réalistes » sont mis en œuvre : tests de toxicité chronique, essai tunnel ou plein champs. En effet, Selon les principes énoncés dans le règlement (CE) n°546/2001, il n'est pas accordé d'autorisation en cas d'exposition potentielle des abeilles communes si les quotients de risque d'exposition des abeilles par contact ou par voie orale sont supérieurs à 50 (valeur définie par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes – OEPP, à partir des accidents constatés dans le cas de traitements par pulvérisation) sauf si des essais en conditions plus réalistes (tunnel puis plein champ) concluent à un risque acceptable.

Aujourd'hui les pratiques d'évaluation des risques des produits phytopharmaceutiques en France peuvent tenir compte d'une DL_{50} à 10 jours. Toutefois, l'utilisation de cette valeur de référence ne fait l'objet d'aucune réglementation.

Le tableau 4 ci-dessous liste les éléments (cf. colonne « Règlement 1107/2009 (projets d'annexes) ») d'évolution des normes actuelles vers une prise en compte, notamment, de l'exposition à faibles doses et répétée dans le temps de l'abeille avec les facteurs chimiques exogènes de son environnement (les évolutions correspondent aux éléments soulignés du tableau). Ces ajouts sont actuellement discutés pour être pris en compte dans les schémas d'évaluation qui figureront en annexe du Règlement 1107/2009, en remplacement des annexes II et III de la Directive 91/414 encore en vigueur. Ils doivent être votés au cours de l'année 2012 et entreront en application à la suite de ce vote, dans un délai qui sera fixé par la Commission européenne.

⁷ En pratique, il est déterminé une LOEC, la NOEC étant la concentration expérimentale juste inférieure.

⁸ Le Quotient de Risque est calculé en faisant le rapport de la dose de produit à l'hectare sur la DL_{50} (μ g/abeille). Dans ce calcul, la dose/ha est l'estimateur d'exposition, la DL_{50} , l'estimation de la toxicité.

Tableau 4 : Essais actuellement requis pour l'évaluation et ajouts en cours de discussion (projets d'annexes⁹)

	Exigences actuelles de la Directive 91/414	Projets d'annexes au Règlement 1107/2009
Essais requis pour toutes les substances	Toxicité aiguë par voie orale Toxicité aiguë par contact	Toxicité aiguë par voie orale Toxicité aiguë par contact <u>Essai sur le développement du couvain</u> <u>Essai d'exposition répétée par voie orale lorsqu'un protocole sera disponible</u>
Essais requis pour les régulateurs de la croissance des insectes	Essai sur le développement du couvain	-
Essais requis pour l'évaluation affinée des risques	Essais permettant d'appréhender les effets à moyen et long terme sur les ruches : en cage, en tunnel, en champ Mesures de résidus dans les matrices consommées par les abeilles	Essais permettant d'appréhender les effets à moyen et long terme sur les ruches : en cage, en tunnel, en champ Mesures de résidus dans les matrices consommées par les abeilles
Essais requis pour les substances systémiques	Aucun. Cependant, l'Anses suit l'approche développée dans les documents EPPO_1-170(4) et EPPO_3-10(3) publiés en 2010.	<u>Approche développée dans les documents EPPO_1-170(4) et EPPO_3-10(3) publiés en 2010.</u>

Le GECU rappelle (cf. 3.2) que les caractéristiques toxico-cinétiques des produits phytopharmaceutiques chez l'abeille, dont la connaissance reste pour l'instant très incomplète, doivent être prises en compte pour affiner l'évaluation des risques liés à ces produits.

Le GECU recommande que des réflexions et des recherches méthodologiques puissent être conduites sur les éléments qui suivent afin d'affiner l'évaluation des risques liés aux produits phytopharmaceutiques pour l'abeille :

- **Prise en compte et évaluation de la toxicité chronique**

L'exposition durable, parfois permanente, des colonies d'abeilles dans leur environnement à de très faibles doses de produits phytopharmaceutiques incite à la détermination de valeurs de référence de toxicité chronique, et à leur prise en compte dans l'évaluation des risques liés à ces produits.

Le Gecu souhaiterait que soit considérés dans les protocoles d'évaluation :

- une augmentation de la durée d'expérimentation et de la durée d'exposition des abeilles aux faibles doses de pesticides (cf. l'étude réalisée par Pettis *et al.* [2012], qui a pris en compte des colonies d'abeilles exposées durant plusieurs semaines),
- la prise en compte des effets des produits sur les générations successives.

Par ailleurs, il serait opportun de s'interroger sur la nécessité de prendre en compte les effets sublétaux d'expositions chroniques aux insecticides sur la dynamique de population des colonies d'hyménoptères (étude chez le bourdon, Whitehorn *et al.*, 2012) et sur les capacités d'orientation des abeilles butineuses (étude chez les butineuses, Henry *et al.*, 2012).

⁹ Le tableau liste les requis tels qu'ils figurent actuellement dans les projets d'annexes (documents Sanco/11802/2010 et Sanco/11803/2010).

A ce sujet, l'Anses a été saisie par la DGAI afin d'indiquer si la publication d'Henry *et al.*, (2012) était de nature à remettre en cause les conclusions de l'évaluation des risques conduites sur la substance active thiaméthoxam ainsi que les différents produits en contenant. La saisine est en cours d'instruction par le CES « Produits phytopharmaceutiques ».

Compte tenu des modèles expérimentaux déjà décrits et qui semblent de plus en plus performants et pertinents, le Gecu a considéré que la toxicité chronique des produits phytopharmaceutiques devrait pouvoir être évaluée dans un premier temps en laboratoire.

Les essais sous tunnel ou en plein champs doivent permettre ensuite une première appréciation d'effets sublétaux sur la santé des colonies d'abeilles.

Il a considéré que des recherches ultérieures sont nécessaires avant la réalisation d'essais en plein champ. Il est en effet nécessaire de mieux comprendre les phénomènes de compensation mis en jeu au niveau des colonies exposées aux facteurs de stress.

- **Prise en compte et évaluation des interactions possibles entre plusieurs facteurs de stress**

Le caractère multifactoriel des mortalités d'abeilles, récemment objectivé et de plus en plus exploré, est un nouvel élément à prendre en compte dans l'évaluation des risques liés aux produits phytopharmaceutiques. Ainsi un volet additionnel de l'évaluation de ces produits pourrait comprendre des essais en conditions contrôlées, incluant des abeilles soumises à un stress biologique considéré comme « équivalent » à celui auquel les ruchers français sont majoritairement exposés (ceci est déjà partiellement pris en compte puisque les colonies utilisées dans les essais de laboratoire ou sur le terrain ne sont pas exemptes de « maladie », elles ne présentent pas de symptômes appréciables visuellement et sont donc considérées comme étant en bon état sanitaire). Le Gecu a suggéré la réalisation d'une infection d'épreuve standardisée avec plusieurs agents pathogènes administrés séparément ou simultanément, et une exposition à des doses de produits en relation avec les doses réelles d'exposition dans l'environnement.

Le Gecu a estimé que la réflexion méthodologique pourrait également concerner l'évaluation du risque lié à une co-exposition à plusieurs pesticides, pour lesquels des NOEL¹⁰ tenant compte d'éventuels effets synergiques avec des agents pathogènes pourraient être définies.

- **Appréciation de l'exposition**

L'exposition des abeilles aux pesticides dans les conditions naturelles dépend de plusieurs facteurs dont :

- le comportement de butinage des abeilles en fonction des besoins de la colonie pour son développement ;
- les conditions environnementales liées aux conditions géographiques (conditions météorologiques, saison et ressources pollinifères et nectarifères des régions du sud *versus* celles des régions du nord de l'Europe) ;
- la configuration de l'espace traité (taille des parcelles, distance entre les colonies et les parcelles, type et durée des traitements, *etc.*).

La prise en compte de ces facteurs est importante dans les essais réalisés en plein champ, afin de s'assurer de la réelle exposition des abeilles. La généralisation de la mesure de l'exposition des abeilles (par une analyse des résidus, du comportement, *etc.*) est également nécessaire et doit être accompagnée du développement de méthodes standardisées. Enfin, l'utilisation d'un nombre suffisant de colonies tenant compte de la variabilité inter-colonies, ainsi que le développement d'outils statistiques adéquats, sont importants.

Des propositions détaillées sur l'ensemble de ces aspects méthodologiques devraient être développées au sein d'un groupe de travail dédié.

Il est à noter qu'à l'EFSA, un groupe de travail coordonné par l'unité "Pesticides" a été mis en place en septembre 2011, avec pour mission de réaliser un état des lieux des connaissances scientifiques sur lesquelles appuyer une évolution des méthodes d'évaluation des risques pour les abeilles liés aux pesticides (mandat M-2011-0185; EFSA-Q-2011-00417). Un premier avis de

¹⁰ NOEL : (no observed effect level) : dose sans effet observable.

l'EFSA sera prochainement publié, comprenant le bilan des connaissances scientifiques dans le domaine. Le travail méthodologique sera réalisé par un deuxième groupe de travail EFSA et fera l'objet d'une consultation publique dans le courant de la deuxième moitié de l'année 2012 pour être finalisé en décembre 2012 (EFSA-Q-2011-00418).

5.2.3 Recommandations de recherche

L'analyse de la publication de Vidau *et al.* (2011) et la prise en compte d'autres articles scientifiques sur le même sujet ont conduit à compiler une liste des questions de recherche qui restent ouvertes.

Caractère multifactoriel des mortalités d'abeilles

L'hypothèse d'une origine multifactorielle des mortalités d'abeilles semble se confirmer à travers les publications des trois dernières années, qui apportent des faisceaux d'informations convergents. L'habitat de l'abeille, les aspects nutritionnels, la diversité génétique (intra et inter colonie), l'usage réglementé de substances autorisées comme les pesticides, l'exposition des abeilles aux contaminants tels, par exemple, les polluants organiques persistants ou les métaux lourds, sont autant de facteurs pouvant interagir avec les agents pathogènes spécifiques de l'abeille en favorisant leur multiplication chez l'hôte ou en exacerbant leur virulence. Les rôles de chacun de ces facteurs environnementaux, ainsi que leurs interactions, entre eux et avec les agents infectieux, devraient faire l'objet de recherches fondamentales et appliquées. La tolérance des colonies d'abeilles à ces agents stressants, tout comme leur réceptivité et sensibilité aux agents infectieux, devraient également être examinées au regard de facteurs intrinsèques innés (génétiques) ou acquis (âge, fonctions, *etc.*).

Vers des protocoles expérimentaux détaillés et la génération de données permettant des méta-analyses

Au vu de la multiplication récente d'essais au laboratoire portant sur les interactions entre facteurs de stress, dont les variables peuvent différer d'un essai à l'autre, mais ne sont pas toujours rapportées, le Gecu a estimé qu'il serait utile, notamment afin de conduire à terme des méta-analyses sur les données expérimentales produites, que les protocoles d'études soient décrits de façon très détaillée, et que les données brutes soient accessibles sur des sites dédiés après la publication des travaux.

Nosémose

L'analyse de l'article de Vidau *et al.* a permis de relever de nombreuses lacunes dans les connaissances sur ces agents pathogènes, la physiopathologie de ces infections et leur épidémiologie. Ainsi il faudrait notamment,

- (1) sur les parasites du genre *Nosema*,
 - déterminer précisément les prévalences respectives de *N. apis* et *N. ceranae* dans les ruchers en France et mieux comprendre l'épidémiologie de ces infections ;
 - mieux appréhender la diversité génétique chez *Nosema* ;
 - s'attacher à en définir les facteurs de virulence et de pathogénicité ;
 - préciser les doses-seuil d'organismes viables (spores) nécessaires et suffisantes pour entraîner une infection, suivie ou non de maladie cliniquement détectable, que ce soit au niveau individuel et à l'échelle d'une colonie ;
 - définir un ou des paramètres mesurables au niveau individuel et à l'échelle de la colonie, qui constituent des indicateurs de la sévérité de l'infection.
- (2) sur l'hôte (abeille et colonie),
 - préciser les facteurs de réceptivité et de sensibilité ;
 - à l'échelle de la colonie, d'améliorer la compréhension de l'évolution de la maladie (transmission, distribution) au sein des ruches et déterminer les phénomènes de compensation résultant de l'infection (augmentation de la ponte, réduction de la durée de vie des nourrices *etc.*).

- (3) sur les relations hôtes-parasites,
- mieux comprendre les relations possibles entre la charge parasitaire (individuelle) ou la prévalence dans la ruche, d'une part, et les effets cliniques ou la mortalité ;
 - étudier les mécanismes physiopathologiques et immunologiques impliqués au niveau de l'intestin moyen de l'abeille.

Toxicologie des pesticides chez l'abeille

Profils toxicologiques et toxicocinétique des insecticides chez l'abeille

En raison des particularités métaboliques de l'abeille, la détermination des éléments de base de la toxicocinétique des insecticides (demi-vie, nature et toxicité des métabolites, effets potentiellement cumulatifs, effets synergiques possibles) est particulièrement recommandée.

Enzymes impliquées dans les étapes de métabolisation des pesticides

La publication de Vidau *et al.* a soulevé des interrogations conduisant à recommander des investigations approfondies quant :

- à l'influence des caractéristiques nutritionnelles de l'alimentation (sucrose/pollen-miel) de l'abeille sur l'induction du système de métabolisation (influant sur la toxicité de certains pesticides) ;
- aux effets d'agents pathogènes ou de pesticides sur l'induction ou l'inhibition des phases I et II du processus de métabolisation, et sur les protéines de transport membranaire (P glycoprotéines) ainsi que les conséquences sur la toxicité des molécules testées ;
- à l'influence de l'âge des abeilles sur la production des protéines des phases I et II du processus de métabolisation ainsi que des P-glycoprotéines membranaires ;
- à l'influence des enzymes de métabolisation dans la production d'hormones ou de phéromones qui déterminent les relations sociales et le fonctionnement global de la colonie.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Tels sont les éléments d'analyse que l'Anses est en mesure de fournir en réponse à la saisine concernant une demande d'avis sur l'article de Vidau *et al.* relatif aux effets de l'exposition d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride. L'Agence souligne l'importance de cet article dans la mesure où les effets démontrés interviennent à des niveaux d'exposition inférieurs aux doses létales connues chez les abeilles saines, même si ceux-ci sont, au moins en ce qui concerne le thiaclopride, supérieurs à ceux auxquels sont exposées les abeilles dans les conditions de leur environnement. Dans un contexte de mortalité des abeilles, cette publication constitue toutefois un signal à prendre en compte qui s'inscrit de plus dans un cadre scientifique cohérent de publications de même nature.

Au-delà des enjeux de recherche relatifs à la mortalité des abeilles, l'Anses note plus particulièrement la nécessité de renforcer les connaissances des caractéristiques toxico-cinétiques de certains produits phytopharmaceutiques chez l'abeille. L'Agence souligne de plus la nécessité d'une évolution d'ores et déjà engagée du contexte réglementaire européen relatif à l'évaluation des produits phytosanitaires visant à une meilleure prise en compte des effets de l'exposition à des doses faibles et répétées de l'abeille à des facteurs chimiques exogènes de son environnement.

L'Agence constituera prochainement un groupe d'expertise collective qui se saisira de ces questions liées à la co-exposition des abeilles aux toxiques et aux agents pathogènes.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Abeilles, mortalités, multifactoriel, interactions entre facteurs, insecticides, nosérose, thiaclopride, fipronil, Nosema ceranae, toxicité chronique, Vidau et al.

ANNEXE(S)

Annexe 1 La nosérose (selon Afssa, 2009)

Agent pathogène : *Nosema apis* et *Nosema ceranae* (déclassés des protozoaires et classés dans les microsporidies [Adl *et al.*, 2005]). Ces microsporidies sont désormais apparentées à des champignons unicellulaires eucaryotes, parasites intracellulaires obligatoires, comprenant plus de 1 200 espèces (Adl *et al.*, 2005). *N. apis* et *N. ceranae* sont présents dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen des abeilles adultes.

Réglementation : inscrit sur la liste de l'OIE et des anciennes MARC en France pour *N. apis* seulement.

Historique et répartition géographique : *Nosema apis* Zander, a été décrit en 1909 et identifié comme agent causal de la nosérose de l'abeille domestique. *N. ceranae*, a été identifiée en 1996 dans des colonies d'*Apis cerana*, en Asie (Fries *et al.*, 1996). Ce parasite a, par la suite, été détecté en Espagne, où un dépeuplement progressif de nombreuses ruches d'*A. mellifera* a été constaté (Higes *et al.*, 2005). Observé dès la fin des années 1990, ce phénomène s'est accentué, en particulier au cours de l'automne-hiver de l'année 2004 et au printemps 2005. Higes *et al.* (2005) ont ensuite détecté la présence de ce nouveau parasite dans 90 % à 97 % des foyers analysés sur l'ensemble du territoire espagnol. Ces deux microsporidies sont actuellement présentes en France (Chauzat *et al.*, 2007). Leur distribution géographique actuelle (*N. apis* et *N. ceranae*) est mondiale (Klee *et al.*, 2007 ; Paxton *et al.*, 2007).

Une sensibilité accrue des spores de *N. ceranae* aux basses températures a été rapportée (Gisder *et al.*, 2010 ; Higes *et al.*, 2010, Fries, 2010, Forsgren *et al.*, 2010, Fenoy *et al.*, 2009 ; Paxton *et al.*, 2007 ; Malone *et al.*, 2001). Cet aspect aurait des conséquences sur la répartition géographique de ce parasite et l'existence d'un gradient de présence décroissant du sud vers le nord de l'Europe (Klee *et al.* 2007 ; Fries *et al.*, 2006 ; Fries, 2010).

Manifestations cliniques : dans les régions caractérisées par un climat tempéré, la nosérose à *N. apis* est connue comme entraînant des signes cliniques sévères chez les abeilles adultes.

Pour les vétérinaires spécialisés dans les maladies de l'abeille, (<http://www.apivet.eu/la-nosmose-une-maladie-pr.html>) « la présence des spores n'est pas une preuve absolue que le parasite soit la cause de la pathologie observée sur les colonies ou sur les pertes constatées ». Ces mêmes vétérinaires considèrent « généralement qu'une ruche est atteinte si une forte proportion d'abeilles est infectée à plus de 50 millions de spores par individu ». Cependant, ce chiffre n'est validé par aucune publication scientifique et reste à démontrer compte tenu des diverses conditions favorisantes nécessaires à l'expression de la maladie.

Les symptômes sont nombreux et souvent associés à d'autres maladies (notamment, amibiase). L'infection à *N. apis* entraîne des effets sur les glandes hypopharyngiennes (Wang et Moeller, 1971) et des effets comportementaux sur le vol des butineuses (difficultés de vol) (L'arrivée, 1963 ; Somerville, 2005 ; Coineau et Fernandez, 2007). Les principaux signes d'appel décrits, associé à la nosérose à *N. apis*, consistent en de fortes dysenteries, mais également dans certains cas :

- une accumulation des abeilles mortes à l'entrée de la ruche (Somerville, 2005) ;
- une réduction de la durée de vie des abeilles infectées (Maurizio, 1946 ; Kleinschmidt et Furguson, 1989) ;

- une mortalité précoce des butineuses (Somerville, 2005);
- une augmentation de la mortalité hivernale (Jeffree, 1955 ; Fries, 1988).

La maladie évolue de façon chronique ou aiguë, se caractérisant par un effondrement des colonies atteintes, conduisant généralement à leur mort (Martín-Hernández *et al.*, 2007). L'intensité de la manifestation des signes cliniques dépend (Fries, 1993) :

- de la souche d'abeille ;
- de la vigueur de la colonie ;
- de la période de l'année ;
- du climat et du degré d'infection ;
- et des synergies avec d'autres pathogènes (notamment, les virus).

Depuis quelques années, une modification de la symptomatologie de cette pathologie a été observée ; seules subsistent des mortalités d'abeilles et des affaiblissements de colonies. Cette modification pourrait être due au changement d'agent pathogène (*N. ceranae* au détriment de *N. apis*) qui semble s'être opéré ces dernières années.

L'infection par *N. ceranae* n'entraîne pas de symptômes caractéristiques mais a pour conséquences (Higes *et al.*, 2006) :

- un stress énergétique (Mayack et Naug, 2009) ;
- un dépeuplement des colonies, diminution de la production de miel et de pollen ;
- une diminution de la vigueur des colonies.

La maladie diffuse par l'intermédiaire des abeilles et de l'apiculteur (par exemple *via* l'utilisation d'instruments souillés par les matières fécales d'abeilles infectées). La contamination naturelle, *via* les excréments d'ouvrières infectées, se fait exclusivement par les spores de *Nosema* sp. Les abeilles domestiques effectuent normalement leur vol de propreté, au cours duquel elles se débarrassent de leurs excréments, à l'extérieur de la ruche. Cependant, lors d'épisode de dysenterie et des périodes de claustration liées aux conditions climatiques, elles les rejettent dans la ruche, les autres ouvrières se contaminant lors des activités de nettoyage ou par l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminées (Fries, 1993 ; Coineau et Fernandez, 2007). L'importance du pouvoir infectieux et contaminant de la nosérose à *N. apis* réside dans la grande résistance des spores lorsqu'elles sont dans les fèces ou les cadavres d'abeilles (Borchert, 1970 ; Malone *et al.*, 2001).

Si *N. apis* ne semble pas être la cause directe du dépérissement des abeilles domestiques (Oldroyd, 2007), cet agent a néanmoins été identifié au cours de l'étude métagénomique menée sur le CCD (Colony Collapse Disorder) comme un marqueur potentiel de ce syndrome, avec une valeur prédictive de 73 % (Cox-Foster *et al.*, 2007). L'infection par *N. ceranae* a été évaluée lors de cette même étude avec une valeur prédictive de 63 % pour les colonies d'*A. mellifera* (Cox-Foster *et al.*, 2007). Par ailleurs, une relation entre la présence de *N. ceranae* dans les colonies et la dépopulation de celles-ci a clairement été mise en évidence (Martín-Hernández *et al.*, 2007 ; Higes *et al.*, 2008). Enfin, Paxton *et al.* ont montré que cette nouvelle microsporidie pourrait entraîner significativement plus de mortalité chez *A. mellifera* que *N. apis* (Paxton *et al.*, 2007).

Annexe 2 : Risques liés à une exposition au Thiaclopride (selon l'Avis de l'Anses, 2010-1483-DESIMO)

« Les risques pour les abeilles ont été évalués selon les recommandations des documents Sanco/10329/2002 et OEPP35. Le thiaclopride présentant un caractère systémique, le schéma d'évaluation présenté dans cette norme publiée en 2010 a été suivi.

• Quotients de risque

Conformément aux termes de l'arrêté du 6 septembre 1994 portant application du décret n° 94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques, les quotients de risque (HQ^{11}_o et HQ_c) ont été calculés pour la dose revendiquée.

Les HQ, qui comparent les doses de produits appliquées à l'hectare aux valeurs de DL_{50} mesurées lors d'essais de toxicité aiguë, ont été définis pour des produits appliqués en pulvérisation et ne sont donc pas pertinents pour les produits utilisés en traitement de sol ou de semences¹². Toutefois, les valeurs de HQ par contact et par voie orale ont été calculées.

Les essais de toxicité aiguë ont été effectués en conformité avec la ligne directrice 170 de l'OEPP¹³.

	DL_{50} contact ($\mu\text{g sa/abeille}$)	DL_{50} orale ($\mu\text{g sa/abeille}$)
Thiaclopride	38,82	17,32
DESIMO (préparation à base de thiaclopride)	92,3	1,9
Thiaclopride-amide	> 100	> 108
Alcool 6-chloropicolyl	> 100	> 107

Les valeurs de HQ ont été calculées pour le thiaclopride et ses métabolites en comparant les doses à l'hectare aux valeurs de toxicité aiguë.

	Dose (g/ha)	HQ contact	HQ oral
Thiaclopride (PM = 252,7 g/mol)	110	2,8	6,4
Thiaclopride-amide (PM = 270,7 g/mol)	118	< 1,2	< 1,1
Alcool 6-chloropicolyl (PM = 143,6 g/mol)	< 110	< 1,1	< 1,1

Les valeurs de HQ relatives à l'exposition orale (HQ_o) et de contact (HQ_c) sont inférieures à la valeur seuil de 50 proposée à l'annexe VI de la directive 91/414/CEE.

• Risques selon les voies d'exposition possibles

1) Exposition liée à la récolte des matrices de la culture traitée et calculs de TER^{14,15}

Le maïs n'étant pas une plante nectarifère, seul le pollen est considéré comme matrice consommée par les abeilles.

¹¹ QH (HQ) : Hazard quotient (quotient de risque).

¹² Document Sanco/10329/2002 rev 2 final chapitre 4.

¹³ OEPP : Organisation Européenne de la Protection des Plantes.

¹⁴ Alix *et al.* 10th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, 2008, p. 27-33, Environmental risk assessment scheme for plant protection products – Chapter 10: Honey Proposed scheme.

¹⁵ Schéma proposé par l'ICP-BR et intégré dans la révision 2010 du schéma d'évaluation des risques pour les abeilles.

L'exposition a été mesurée dans les pollens de plantes de maïs issues de semences traitées avec la préparation évaluée. Les concentrations en thiaclopride et thiaclopride-amide sont toujours inférieures à la limite de quantification de 0,001 mg/kg (n = 36). Pour les calculs, la concentration de 1 µg/kg est donc retenue pour le thiaclopride et le thiaclopride-amide.

Le métabolite alcool 6-chloropicolyl glucoside n'a pas été mesuré dans les pollens de maïs. En se basant sur une étude de métabolisme dans le tournesol, ce métabolite est présent dans les inflorescences à une concentration 9 fois supérieure à la concentration en thiaclopride-amide. Pour les calculs, la concentration de 10 µg/kg est donc retenue pour l'alcool 6-chloropicolyl glucoside. En utilisant ces concentrations et la dose maximum de pollen pouvant être ingérée par une abeille nourricière¹⁶, une dose journalière d'exposition a été calculée. La dose journalière d'exposition d'une abeille.

	Exposition µg/abeille/jour	Toxicité µg/abeille	TER
Thiaclopride	12 x 10 ⁻⁶	17,32	1 400 000
Thiaclopride-amide	12 x 10 ⁻⁶	> 108	9 000 000
Alcool 6-chloropicolyl glucoside	12 x 10 ⁻⁵	> 107	8 800 000

Ces calculs confirment que les niveaux d'exposition des abeilles via le pollen de maïs traité avec la préparation évaluée sont très faibles. Les valeurs de TER obtenues étant supérieures au seuil de 10 proposé par la norme OEPP, les risques pour les abeilles sont faibles.

2) Exposition aux poussières de semis

Les risques liés aux poussières de semis ont été évalués pour un taux maximum de 0,3 % mesuré sur le sol et de 1,83 % mesuré sur une structure verticale lors d'essais réalisés avec des semoirs équipés de déflecteurs visant à rabattre les poussières vers le sol au moment des semis¹⁷. L'exposition des abeilles, 2,01 g sa/ha a été comparée à la toxicité de la préparation évaluée au moyen d'un calcul de HQ.

Substance	Dose	DL₅₀ contact	HQ contact	DL₅₀ orale	HQ oral
Thiaclopride	2,01 g/ha	92,3 µg sa/abeille	0,02	1,9 µg sa/abeille	1,1

Comme les valeurs de HQ relatives à l'exposition orale (HQ_o) et de contact (HQ_c) sont inférieures à la valeur seuil de 50, les risques pour les abeilles sont considérés comme acceptables.

3) Exposition aux gouttelettes de guttation

Cette évaluation s'appuie sur :

- des mesures de résidus (thiaclopride, thiaclopride-amide) dans les gouttelettes de guttation (113 échantillons),
- sur les DL₅₀ de toxicité orale du thiaclopride (17,32 µg sa/abeille) et du thiaclopride-amide (supérieure à 108 µg sa/abeille qui est une dose sans effet observé), et
- sur la plus forte dose non létale de 0,77 µg sa/abeille issue de 8 études de toxicité orale aiguë réalisées avec la substance active technique ou des préparations contenant la substance active.

Pour le thiaclopride, la concentration pouvant entraîner 50 % de mortalité calculée à partir de la DL₅₀ orale est de 700 µg sa/L et la plus forte concentration non létale calculée à partir de la plus forte dose non létale est de 40 µg sa/L. Pour le thiaclopride-amide, la concentration non létale est de 5400 µg/L.

Les concentrations en thiaclopride dépassent ponctuellement la plus forte concentration non létale du thiaclopride seulement pour 3 échantillons (41, 43 et 50 µg sa/L). Cependant, les concentrations dans tous les échantillons sont très largement inférieures à la concentration pouvant entraîner 50 % de mortalité (700 µg sa/L). La concentration maximum de 16 µg thiaclopride-amide/L est très

¹⁶ Une abeille nourricière ingère en moyenne 6,5 mg pollen par jour et une ingestion maximum de 12 mg pollen en un jour a été mesurée (Rortais et al. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar. Apidologie 36, p.71-83).

¹⁷ Emploi rendu obligatoire en France (Arrêté du 13 avril 2010) (cf .avis de l'AFSSA saisine n° 2008-SA-0389).

largement inférieure à la concentration non létale de 5400 µg/L. Ces comparaisons permettent de conclure que les risques liés à la récolte et l'ingestion de guttelettes de guttation sont faibles.

4) Exposition liée à la récolte de matrices récoltées sur une culture suivante non traitée

Le thiaclopride n'étant pas persistant dans le sol, les risques pour les abeilles consommant les matrices d'une culture suivante mellifère non traitée sont considérés comme négligeables. Les métabolites thiaclopride-amide et thiaclopride acide sulfonique sont persistants mais l'exposition via les cultures suivantes est négligeable (conclusion de l'EFSA, 2009).

● Essais conduits dans les conditions pratiques d'utilisation

Bien que non requis sur le plan réglementaire au regard des calculs de TER présentés ci-dessus, un essai sous tunnel et un essai au champ ont été réalisés en exposant des colonies lors de la floraison de plantes de maïs issues de semences traitées avec la préparation évaluée. L'essai au champ a permis d'exposer les abeilles à une floraison prolongée par la réalisation de semis décalés et d'observer les ruches jusqu'à leur sortie de l'hivernage suivant cette exposition.

Ainsi, dans des conditions de terrain, le traitement au moment du semis du maïs avec la préparation évaluée à une dose de 110 g sa/ha n'a pas entraîné d'impact inacceptable sur les larves, le comportement des abeilles, la survie et le développement des colonies, cet impact étant suivi sur une période d'observation incluant un hivernage.

Les risques pour les abeilles et autres pollinisateurs liés à l'utilisation de la préparation DESIMO en traitement de semences de maïs sont considérés comme acceptables. »

Données de la base Agritox sur le thiaclopride (issues du dossier européen) :

❖ Toxicité aiguë :

- **Apis mellifera - DL50 Contact : 38.82 µg/abeille - DL50 Orale : 17.32 µg/abeille** - Durée d'exposition : 48 heures (Source de l'information : union européenne).
- **préparation : YRC 2894 (SC à 480 g SA/L)**
Apis mellifera - DL50 Contact : 51.6 µg/abeille - DL50 Orale : 8.51 µg/abeille - Durée d'exposition : 48 heures (Source de l'information : union européenne).

❖ Observations :

- Effets létaux d'une exposition à des feuilles de luzerne traitées avec la préparation YRC 2894 SC 480 à raison de 50, 100 et 200 g SA/ha, < 7.3% (24 h), RT25 (temps requis pour observer une réduction de la toxicité de la SA et pour observer une mortalité de 25% au plus), < 2 h.
- Étude en semi-terrain : l'exposition d'abeilles aux résidus d'une application de la préparation YRC 2894 SC 480 (188 g SA/ha) sur *Phacelia* en fleurs n'induit aucune mortalité, ni comportement anormaux.
- Étude en tunnel : l'exposition d'abeilles aux résidus d'une application de la préparation YRC 2894 SC 480 (0.375 l/ha soit 180 g SA/ha) sur *Phacelia tanacetifolia* en fleurs n'induit aucune mortalité, ni comportements anormaux.

Annexe 3 : Risques liés à une exposition au Fipronil (EFSA, 2006)

Risques pour les abeilles

Les études en laboratoire ont mis en évidence les effets toxiques aigus du fipronil par contact et par ingestion chez l'abeille adulte. Des études complémentaires ont mis en évidence une toxicité équivalente du métabolite MB 46136 à celle de la molécule parent et une toxicité moindre du métabolite RPA 200761. L'expertise européenne pour l'évaluation du risque du fipronil pour les abeilles n'a toutefois pas jugé nécessaire de poursuivre les essais sur le métabolite MB 46136, en raison des moindres risques liés aux doses d'exposition dans le cadre de semences traitées au fipronil.

L'évaluation de risques européenne a conclu que le calcul d'HQ pour un usage en traitement de semences n'était pas approprié.

Plusieurs niveaux d'études (sous tunnel et au champ) ont été mis en œuvre pour déterminer le risque lié à l'utilisation du fipronil en traitement de semences de maïs et de tournesol.

Trois études sous tunnel pour lesquelles le fipronil a été utilisé en traitement de semences de tournesol ont été jugées valides. De nombreuses observations ont été réalisées afin d'apporter des réponses aux questions exprimées pendant l'évaluation. Aucun résidu de fipronil, MB 46136, MB 46513, MB 45950 et RPA 200766 n'a été quantifié (LOQ (limite de quantification) = 0,5 µg/kg) dans les échantillons de matrices apicoles appropriées : pollen (trappe à pollen et cadre), miel (cadre) et nectar (contenu stomacal), au cours des différentes études.

Dans un protocole expérimental conduit en plein champ en France de 1999 à 2004 sur des tournesols en fleurs, toutes les mesures de résidus étaient en deçà de la limite de quantification variant entre 0,0005-0,002 mg/kg.

Des études en plein champ ont également été conduites dans le but de mesurer les résidus de fipronil et ses métabolites (MB 46513, MB 45950, MB 46136 et RPA 200766) dans le pollen de maïs, en France, en Allemagne et en Espagne. Aucun résidu de fipronil ou de ses métabolites n'a été détecté dans les échantillons analysés (limite de détection : 0,0005 mg/kg). Dans les essais du pétitionnaire conduit sur huit champs, la même conclusion a été apportée. Par contre, aucune étude de toxicité intrinsèque vis-à-vis des larves n'a été fournie.

Dans le cadre de l'expertise collective européenne, il a été considéré qu'au travers des usages de semences de maïs et de tournesol traitées au fipronil, les études de surveillance montraient une faible exposition des abeilles et qu'aucun effet néfaste n'était observé dans les études sous tunnel. Cependant, l'évaluation de risques européenne n'a pas pu conclure quant au risque pour les abeilles adultes pour les usages représentatifs de traitement de semence de maïs ou de tournesol sans que les données récemment soumises quant au risque sur les larves soit également analysées et le risque pour les larves évalué. L'EFSA a également insisté sur le fait que les études disponibles ont été majoritairement conduites en France et que les autres États membres devraient considérer la pertinence de ces études dans des conditions environnementales représentatives de leurs pays.

Données de la base Agritox sur le fipronil (issues du dossier européen) :

❖ Toxicité aiguë :

- ***Apis mellifera*** - DL50 Contact : 0.00593 µg/abeille - DL50 Orale : 0.00417 µg/abeille - Durée d'exposition : 48 heures (Source de l'information : union européenne).
- **métabolite : métabolite sulfone (oxydation de la substance)**
Apis mellifera - DL50 Orale : 0.0064 µg/abeille - Durée d'exposition : 96 heures (Source de l'information : union européenne).
- **métabolite : métabolite acide carboxylique (hydrolyse du métabolite carboxamide)**
Apis mellifera - DL50 Orale : >0.29 µg/abeille - Durée d'exposition : 48 heures (Source de l'information : union européenne).

❖ **Observations :**

Monographie initiale (2004)

- Étude sous tunnel : tournesol traité avec FS 500 g/l, pas d'effet nocif observé.
- Analyses de résidus de fipronil et des métabolites sulfone, sulfure et desulfinyl dans le nectar, le pollen, les fleurs, le miel, les abeilles: résidus < LOQ (limite de quantification) 2 µg/kg
- Étude sous tunnel : tournesol traité avec FS 500 g/l, traitement sol avec WG 80% à 200 g s.a./ha avant semis de tournesol non traité, pas d'effet nocif observé.

Addendum de la monographie (2005)

- Étude sous tunnel : tournesol traité avec FS 500 g/l, pas d'effet nocif observé sur l'activité des abeilles butineuses ni sur la survie des abeilles, résidus (fipronil, sulfone, sulfure, desulfinyl, carboxamide) dans le pollen de trappe et le nectar stomacal < LOQ 0.5 µg/kg.
- Étude sous tunnel : tournesol traité avec FS 500 g/l, pas d'effet nocif observé sur l'activité des abeilles butineuses ni sur la survie des abeilles, résultats analytiques non exploitables.
- Base de données analytique dans le pollen et le nectar de tournesol : 44 mesures de résidus < à trois LOQ (2, 1 et 0.5 µg/kg pour le fipronil et ses métabolites sulfone, desulfinyl, sulfure, carboxamide).
- Base de données analytique dans le pollen de maïs : 22 mesures de résidus < LOQ (0.5 µg/kg pour le fipronil et ses métabolites sulfone, desulfinyl, sulfure, carboxamide) sauf deux mesures de fipronil (0.0023 et 0.00079 mg/kg).

Annexe 4 : Comparaison des conditions expérimentales/normes réglementaires d'évaluation de la toxicité

Le tableau 5 liste de façon synthétique les conditions expérimentales des protocoles normalisés des essais de toxicité aiguë utilisés dans un cadre réglementaire, et les conditions expérimentales de l'essai dont sont issus les résultats présentés dans l'article de Vidau *et al.* (2011).

Tableau 5 : Conditions expérimentales (tests de toxicité par voie orale)

	Protocole article	Norme OEPP 170 / LD OCDE 213 Toxicité aiguë par voie orale
Nombre de réplicats	3	3
Nombre d'abeilles par réplicat	50	10
Température d'essai	33 °C	25 ± 2 °C
Age abeilles	5 jours	Jeunes adultes
Type d'abeilles	Abeilles de saison	Abeilles de saison
Alimentation des abeilles avant l'essai	pollen	pollen
Doses d'essai	1 dose	Relation dose-effet (généralement 5 doses testées)
Durée de l'essai	10 jours d'exposition	48 heures
Dosage de la substance	Non	Oui
Expression des résultats	Mortalité cumulée	Mortalité moyenne avec intervalles de confiance
Endpoints dérivés	% mortalité	DL ₅₀
Critères de validité	-	Mortalité dans les lots témoins < 10% à la fin de l'essai

Annexe 5 : Particularités du système de métabolisation de l'abeille et importance de la nutrition dans la toxicité des composés chimiques chez les abeilles

1) Particularités du système de métabolisation de l'abeille

Les abeilles domestiques possèdent l'un des plus faibles nombre d'isoformes de cytochromes P450 (CYPs) (46 isoformes séquencées) parmi tous les invertébrés chez lesquels ces enzymes ont été séquencées (à l'exception du pou humain [*Pediculus humanus*] qui en possède 37). Par exemple, 92 ont été séquencées chez la guêpe parasite (*Nosanioa vitripennis*), 89 chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et 111 chez le moustique (*Anopheles gambiae*). Au regard des groupes spécifiques de CYP, les guêpes parasites présentent un nombre important de gènes pour les CYP4 ou 3 en comparaison du profil génétique des abeilles (par exemple, 22 gènes pour les CYP4 alors que les abeilles n'en présentent que 4).

L'alimentation des abeilles, l'environnement constant et régulé de la ruche, ont conditionné une évolution génétique vers un moindre nombre de gènes de CYP. La sous-famille des CYP6AS (isoformes 1 à 10), spécifique des hyménoptères est relativement majoritaire chez l'abeille, notamment les CYP6AS1, CYP6AS3, CYP6AS4 qui sont capables de métaboliser des composés phytochimiques présents dans l'alimentation de l'abeille. La quercétine, flavonoïde présent dans le miel, est un substrat des trois isoformes CYP6AS1, CYP6AS3, CYP6AS4 et en induit la transcription (Mao *et al.*, 2011). Il a également été démontré que d'autres isoformes CYP9Q2 et CYP9Q3 étaient induites par des extraits de miel.

Au regard des éléments chimiques exogènes, il est rapporté que le tau-fluvalinate induit la transcription des CYP9Q3, alors que la bifenthrine (pyréthrianoïde) augmente la transcription des CYP9Q1 et CYP9Q2 et diminue celle de CYP9Q3.

Certaines études ont suggéré que les composés phytochimiques des aliments de l'abeille sont des substrats naturels de certaines isoformes spécifiques de CYP et peuvent modifier la métabolisation des pesticides (Johnson *et al.*, 2009 ; Mao *et al.*, 2011).

Hawthorne et Dively (2011) ont récemment publié des données préliminaires sur le rôle potentiel des P-glycoprotéines membranaires de transport dans la métabolisation de pesticides et d'antibiotiques chez l'abeille. Les auteurs ont démontré *via* l'usage d'un prétraitement inhibiteur des P-glycoprotéines de transport (vérapamil ou oxytétracycline) que la mortalité des abeilles testées augmentait considérablement après 48 heures d'exposition à trois insecticides néonicotinoïdes (imidaclopride, acétamipride et thiaclopride) et deux acaricides (coumaphos et tau-fluvalinate). Les auteurs concluent que ces cinq composés correspondent à des substrats d'une ou plusieurs protéines de transport membranaires. Cependant, l'effet dose-réponse pour ces composants n'est pas encore connu et des recherches complémentaires sont nécessaires afin de conclure sur le rôle relatif des P-glycoprotéines dans la métabolisation des pesticides et d'autres composés chimiques, en complément d'enzymes telles que les isoformes de CYP.

2) Importance de la nutrition dans la toxicité des composés chimiques chez les abeilles

La nutrition est un facteur essentiel pour la santé des abeilles car elle module leur capacité à métaboliser des toxiques chimiques ou contaminants naturels comme les mycotoxines. En effet, Johnson *et al.* (2012) ont montré que la mortalité d'abeilles exposées à des mycotoxines comme l'aflatoxine était moindre si elle consommait du saccharose et/ou du maïs riche en fructose, en comparaison d'un apport exclusif de saccharose. L'analyse, par Northern blot, de l'expression des gènes dans l'intestin moyen des abeilles a révélé que le miel, le pollen et la propolis induisaient les CYP6AS impliqués dans la détoxification de l'aflatoxine B1, *via* la quercétine, flavonoïde naturel présent dans ces aliments. Les auteurs concluent que la régulation de l'expression des CYPs chez l'abeille est activée par des composés chimiques naturels présents dans la ruche, comme la quercétine, et qu'en termes de capacités de détoxification une alimentation composée de sucre n'équivaut pas au miel de la ruche.

Des inducteurs potentiels de CYPs ont été testés par Johnson *et al.* (2012) afin d'étudier les mécanismes de régulation de la détoxification. Le phénobarbital, connu comme un inducteur de CYP chez de nombreuses espèces d'insectes, n'a pas eu d'effet sur la détoxification du tau-

fluvalinate, dont la métabolisation chez l'abeille fait intervenir les CYP. De façon similaire, par mesure de la tolérance au tau-fluvalinate, l'apport de xantholine, d'acide salicylique ou d'indole-3-carbinole n'a donné lieu à une induction de CYP chez l'abeille, alors que cette induction existe chez les autres insectes. Seule la quercétine, constituant communément retrouvé dans le pollen et le miel, réduit la toxicité du tau-fluvalinate. A l'échelle moléculaire, aucun changement n'a été constaté dans l'expression des gènes de détoxification d'abeilles traitées au phénobarbital, alors qu'une augmentation de l'expression de trois gènes codant pour des CYP6AS a été notée pour les abeilles nourries avec des extraits de miel, de pollen et de propolis.

BIBLIOGRAPHIE

Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R. et al., (2005) *The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. Journal of Eukaryotic Microbiology.* 52 : 399-451.

Afssa (2009) *Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. Rapport 2007-SA-0140.* 222 p. <http://www.anses.fr/Documents/SANT-Ra-MortaliteAbeilles.pdf>.

Alaux C., Brunet J.L., Dussaubat C., Mondet F., Brillard J., Baldy A., Belzunces L.P., Le Conte Y. (2010) *Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybee (Apis mellifera). Environmental Microbiology.* 12 : 774-782.

Anses (2010) *Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation DESIMO, à base de thiaclopride, de la société BAYER SAS. Anses – dossier n° 2010-1483 – DESIMO.* 24p. <http://www.anses.fr/Documents/DPR2010ha1483.pdf>.

Anses (2012) *Avis 2011-SA-0333 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la publication de l'article de Vidau et al. portant sur les effets d'une exposition d'abeilles infectées par Nosema ceranae à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride.* 6 p.

Atkins E. (1992) *Injury to honey bee poisoning.* In Graham J. M. [ed.], *The hive and the honey bee, revised edition.* Bookcrafters, Hamilton, IL. 1155-1203.

Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N. (2012) *Parasite-insecticide interactions: a case study of Nosema ceranae and fipronil synergy on honeybee. Surface Science Reports.* 2 : 326.

Borchert, A. (1970) *La nosérose.* In : *Les maladies et parasites des abeilles.* Editions Vigot frères. Paris. 486 pages. Page 167.

Chauzat M.P., Higes M., Martin-Hernandez R., Meana A., Cougoule N., Faucon J. P. (2007) *Presence of Nosema ceranae in French honey bee colonies. Journal of Apicultural Research.* 46 : 127-128.

Coineau Y., Fernandez N. (2007) *La nosérose.* In : *L'abeille mellifère - Maladies, parasites et autres ennemis.* Editions Atlantica. Collection Atlantisciences. 504 pages. Page 130.

Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., et al. (2007) *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science.* 318 : 283-287.

Dorne J.L. (2010) *Metabolism, variability and risk assessment. Toxicology.*268 :156-164.

EFSA Scientific Report (2006) *Conclusion regarding the Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil (finalised: 3 March 2006 version of 12 April 2006).* 65 : 1-110.

Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernández R., Del Aguila C. (2009) *High-level resistance of Nosema ceranae, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Applied and Environmental Microbiology.* 75 : 6886-6889.

Forsgren E., Fries I. (2010) *Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honey bees. Veterinary Parasitology.* 170 : 212-217.

Fries I. (1988) *Comb replacement and Nosema disease in honey bee colonies. Apidologie.* 19 : 343-354.

Fries I. (1993) *Nosema apis - A parasite in the honey bee colony. Bee World.* 74 : 5-19.

Fries I., Feng F., Da Silva A., Slemenda S.B., Pieniazek N.J. (1996) *Nosema ceranae n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee Apis cerana (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology.* 32 : 356-365.

Fries I., Martín R., Meana, A, García-Palencia P., Higes, M. (2006) *Natural infections of Nosema ceranae in European honey bees (Review). Journal of Apicultural Research.* 45 : 230-233.

Fries I. (2010) *Nosema ceranae in European honey bees. Journal of Invertebrate Pathology.* 103 : 73–S79.

Gisder S., Hedtke K., Möckel N., Frielitz M.C., Linde A., Genersch E. (2010) *Five-year cohort study of nosema spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of nosema ceranae? Applied and Environmental Microbiology.* 76 : 3032-3038.

Guirguis G., Brindley W. (1976) *Effect of chlorcyclizine, aminopyrine, or phenobarbital on carbaryl metabolism in alfalfa leafcutting bees (Hymenoptera- Megachilidae). Environmental Entomology.* 5 : 590–594.

Hamiduzzaman M.M., Guzman-Novoa E., Goodwin P.H. (2010) *A multiplex PCR assay to diagnose and quantify Nosema infections in honey bees (Apis mellifera). Journal of Invertebrate Pathology.* 105 :151-5.

Hardstone M.C., Scott J.G. (2010) *Is Apis mellifera more sensitive to insecticides than other insects? Pest Management Science.* 66 : 1171-1180.

Hawthorne D.J., Dively G.P. (2011) *Killing Them with Kindness? In-Hive Medications May Inhibit Xenobiotic Efflux Transporters and Endanger Honey Bees. PLoS ONE* 6 : e26796. doi:10.1371/journal.pone.0026796.

Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. (2012) A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*. [Epub ahead of print].

Higes M., Martín R., Sanz A., Alvarez N., Sanz A., Del Pilar Garcia M. et al. (2005) Le syndrome de dépeuplement de ruches en Espagne. *La santé de l'abeille*. 211 : 26-37.

Higes M., Martín R., Meana A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92 : 93-95.

Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E.G., González-Porto A.V., Barrios L., Del Nozal M.J., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*. 10 : 2659-69.

Higes M., Martín-Hernández R., García-Palenci P., Marín P., Meana A. (2009) Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*) *Environmental Microbiology Reports*. 1 : 495-498.

Higes M., García-Palencia P., Botías C., Meana A., Martín-Hernández R. (2010) The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environmental Microbiology Reports*. 2 : 745-748.

Holmstrup M., Bindesbøl A.M., Oostingh G.J., Duschl A., Scheil V., Köhler H.R. et al. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment*. 408 : 3746–3762.

Huth-Schwarz A., Settele J., Moritz R.F.A., Bernhard Kraus F. (2012) Factors influencing *Nosema bombi* infections in natural populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. Article in Press.

Jeffree E.P. (1955) Observations on the decline and growth of honey bee colonies. *Journal of Economic Entomology*. 48 : 723-726.

Johnson R.M., Pollock H.S., Berenbaum M.R. (2009) Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*. 102 : 474–479.

Johnson R., Mao W., Pollock H.S., Niu G., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2012). Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(2): e31051. doi:10.1371/journal.pone.0031051

Joo H., Choi K., Rose R.L., Hodgson E. (2007) Inhibition of fipronil and nonane metabolism in human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms by chlorpyrifos. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 21 : 76-80.

Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanett, A., Quyet D.T., et al. (2007) Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96 : 1-10.

Kleinschmidt G.J., Furguson, F. (1989) Honey bee protein fluctuations in the Channel Country of South West Queensland. *Australian Beekeeper*. 91 : 163-165.

L'arrivée J.C.M. (1963) *The effects of sampling sites on Nosema determination. Journal of Insect Pathology. 5 : 349-355.*

Malone L.A, Gatehouse H.S, Tregidga E.L. (2001) *Effects of time, temperature, and honey on Nosema apis (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). Journal of Invertebrate Pathology. 77 : 258-268.*

Maurizio A. (1946) *Beobachtungen über die Lebensdauerung den Futterverbrauch gefangen gehallteren Bienen. Beihefte zur Schweizerischen Bienen-Zeitung. 2 : 1-48.*

Mayack C., Naug D. (2009) *Energetic stress in the honeybee Apis mellifera from Nosema ceranae infection. Journal of Invertebrate Pathology. 100 : 185–188.*

Mao W., Schulerb M.A., Berenbauma M.R. (2011) *CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (Apis mellifera). Proceedings of the National Academy of Sciences. 108 : 12657-12662.*

Martin-Hernandez R., Meana A., Prieto L., Salvador A.M., Garrido-Bailon E., Higes M. (2007) *Outcome of colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae. Applied and Environmental Microbiology. 73 : 6331-8.*

Martín-Hernández R., Botías C., Barrios L., Martínez-Salvador A., Meana A., Mayack C., Higes M (2011) *Comparison of the energetic stress associated with experimental Nosema ceranae and Nosema apis infection of honeybees (Apis mellifera). Parasitology Research 109 : 605–612.*

Meana A., Martin-Hernandez R., Higes M. (2010) *The reliability of spores counts to diagnose Nosema ceranae in honey bees. Journal of Apicultural Research and Bee World. 49 : 212-214.*

Medrzycki P., Sgolastra F., Bogo G., Tosi S., Venturi S. (2011) *Influence of some experimental conditions on the results of laboratory toxicological tests on honeybees. ICPBR, Symposium Hazard of Pesticides to Bees, Wageningen 2-4 November 2011.*

Oldroyd B.P. (2007) *What's killing American honey bees? PLoS Biology. 5 : 1195-1199.*

Paxton R.J., Klee J., Korpela S., Fries, I. (2007) *Nosema ceranae has infected Apis mellifera in Europe since at least 1998 and may be more virulent than Nosema apis. Apidologie. 38 : 558-565.*

Pettis J.S., vanEngelsdorp D., Johnson J., Dively G. (2012) *Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. Naturwissenschaften. 99 : 153–158.*

Ratnieks FL, Carreck NL. (2010) *Ecology. Clarity on honey bee collapse? 327 : 152-3.*

Rivière J.-L. (2006) *Les pesticides : procédures d'autorisation de mise sur le marché. Académie d'Agriculture de France. Séance du 14 juin 2006. 5 pages.*

Smart M.D., Sheppard W.S. (2012) *Nosema ceranae in age cohorts of the western honey bee (Apis mellifera). Journal of Invertebrate Pathology 109 : 148–151.*

Somerville D.C. (2005) *Nosema disease in bees. Agnote-NSW Department of Primary Industries DAI-124.*

Suchail S., Guez D., Belzunces L. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19 : 1901-1905.

Suchail S., Guez D., Belzunces L.P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 : 2482-2486.

Suchail S., De Sousa G., Rahmani R., Belzunces L. P. (2004). In vivo distribution and metabolisation of ¹⁴C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Management Science*. 60 : 1056-1062.

vanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y.P., Underwood R., Tapy D.R., Pettis J.S. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8), e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481.

vanEngelsdorp D., Speybroeck N., Evans J., Nguyen B.K., Mullin C., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Tapy D.R., Haubruge H., Pettis J.S., Saegerman C. (2010) Weighing risk factors associated with bee Colony Collapse Disorder by classification and regression tree Analysis. *Journal of Economic Entomology*. 103 : 1517-1523.

Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Viguès B., Brunet J.-L., Texier C., Biron D. G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L. P., Delbac F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 6(6): e21550. doi:10.1371/journal.pone.0021550.

Wang D.I., Moeller F. E. (1971) Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of workers honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 17 : 308-320.

Whitehorn P.R., O'Connor S., Wackers F.L., Goulson D. (2012) Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science*. [Epub ahead of print].

Williams R. T. (1959) *Detoxication Mechanism*, (2nd ed.), Chapman and Hall, London (1959), p.796.

Wu J.Y., Smart M.D., Anelli C. M., Sheppard W. S. (2012). Honeybees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109 :326-9.