Biocides et abeilles

Rapport final

8 novembre 2012

CAHIER SPÉCIAL DES CHARGES n° DG5/MR/MCL/11051

PROCÉDURE NÉGOCIÉE SANS PUBLICITÉ PRÉALABLE POUR LE

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODOLOGIE D'ANALYSE POUR LES AUTORISATIONS DE MISE SUR LE MARCHE DE PRODUITS BIOCIDES ET MISE A DISPOSITION D'UNE EXPERTISE POUR LES MISSIONS DU SERVICE BIOCIDES DANS LE CADRE DE LA PROTECTION DES POLLINISATEURS.

Note liminaire

Traiter des risques des biocides pour les abeilles suppose une connaissance préalable des deux sujets.

S'agissant de l'abeille, nous pouvons nous appuyer sur les articles scientifiques de biologie ou d'écotoxicologie. Parce qu'elle forme des colonies nombreuses, parce qu'elle est un insecte élevé par l'homme, parce qu'elle dispose de compétences élaborées liées à sa vie sociale, l'abeille est en effet une "espèce modèle" qui fait l'objet d'abondantes recherches depuis que la science existe (voir les illustrations de Réaumur, de Swammerdam, de Beauvoys…). Nous disposons donc d'une information large, qui nous permet de comprendre les particularités de l'abeille et des colonies qu'elle forme, connaissances indispensables à la compréhension des risques que peuvent présenter les xénobiotiques pour cette espèce.

S'agissant des biocides, nous disposons également d'informations sur les propriétés toxiques de ces substances, de façon générale, et souvent aussi pour *Apis mellifera* plus particulièrement. Il s'agit, là aussi, d'une information indispensable : les risques toxiques sont différents selon que l'on considère les insectes ou les mammifères, notamment en ce qui concerne les insecticides, substances que nous allons étudier. Ceux-ci sont généralement des neurotropes ; or, si on retrouve bien les mêmes neurotransmetteurs dans la lignée des Arthropodes et dans celle des Vertébrés, les récepteurs peuvent montrer certaines spécificités, qui sont à l'origine de différences parfois importantes dans le niveau de toxicité d'une même substance entre les deux lignées. Il nous semblait donc nécessaire d'investiguer la littérature relative aux propriétés toxiques des substances considérées. Ces notions seront complétées par l'investigation du devenir de ces substances dans l'air, dans l'eau et dans le sol. Ces connaissances sont en effet indispensables pour apprécier les possibilités/les probabilités d'exposition de l'abeille. Les quantités vendues sur le territoire belge, par substances et par produit, sont également nécessaires à cette appréciation. Enfin, la connaissance élémentaire de la législation relative aux autorisations est également un prérequis nécessaire à l'exécution du travail.

Nous proposons donc d'articuler le travail en quatre parties :

Deux des molécules retenues, fipronil et imidaclopride, font l'objet d'une monographie fondée sur la littérature, monographie centrée sur les voies de dispersion de la molécule dans l'environnement, sur les propriétés toxiques de la molécule pour l'abeille, et sur la probabilité d'une contamination de l'abeille par les biocides sur le territoire belge. Les deux pyréthrinoïdes sont traités dans un dosser du même type, mais qui concerne cette famille de substance de façon plus générale, car la littérature qui les concerne est relativement moins abondante et concerne fréquemment plusieurs substances conjointement; les deux substances retenues figurent d'ailleurs parmi celles dont il est le plus souvent question dans les études toxicologiques portant sur l'abeille. La première partie du rapport, quant à elle, est une introduction présentant les notions-clés relatives à l'abeille et aux particularités de la toxicologie de cet insecte ; ces notions sont en effet nécessaires à la compréhension des quatre monographies. L'introduction est complétée par les notions de législation relative aux procédures d'autorisation, et une brève analyse de celles que nous avons pu consulter. Le tout est introduit par un petit chapitre relatif au contexte de l'étude, celui des surmortalités de colonies d'abeille qui frappent la Belgique comme d'autre pays d'Europe et d'autres continents, Asie et Amérique principalement.

Bonne lecture !

Principaux acronymes utilisés dans ce travail

AEL	Acceptable Exposure Level
CL_{50}	Concentration Létale 50 = concentration en toxique entraînant la mort de 50% des individus en moyenne
CPR	Conclusion on the Peer Review : Conclusion de la revue par les Pairs = document de synthèse, écrit par l'EFSA, de l'évaluation d'une molécule phytosanitaire ; cette conclusion prend en compte le dossier d'évaluation remis par le notifiant ainsi que les remarques et avis des experts des Etats membres (les Pairs). Elle identifie au besoin les lacunes du dossier (les *data gaps*) et conclut sur les niveaux de risque présentés par la molécule sur les plans toxicologique et écotoxicologique
DAR	Draft Assessment Report = dossier scientifique d'évaluation d'une molécule phytosanitaire, présenté par le notifiant pour obtenir l'autorisation d'utilisation de la molécule au niveau européen (c'est à dire son inscription à l'annexe I du règlement (EC)1107/2009)
DL_{50}	Dose Létale 50 = dose toxique entrainant la mort de 50% des individus en moyenne
DT_{50}	Demi vie : temps nécessaire à ce que disparaisse la moitié de la quantité initiale de contaminant
DT_{90}	Temps nécessaire à ce que disparaisse 90% de la quantité initiale de contaminant
LOD	Limit of détection (limite de détection)
LOQ	Limit of quantification (limite de quantification)
NOAEC	No Observed Adverse Effect Concentration : concentration la plus élevée pour laquelle aucun effet adverse n'est observé
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level : dose la plus élevée pour laquelle aucun effet adverse n'est observé
NOEC	No Observed Effect Concentration : concentration la plus élevée pour laquelle un effet donné n'est pas observé
NOEL	No Observed Effect Level : dose la plus élevée pour laquelle un effet donné n'est pas observé
PBO	piperonyl butoxyde, synergiste de plusieurs failles d'insecticides
PEC	Predicted Exposure Concentration = concentration attendue dans l'environnement, et à laquelle l'abeille peut par conséquent se trouver exposée
PER	Proboscis Extension Reflex = réflexe d'extension du proboscis. Ce réflexe a donné lieu à de nombreuses études scientifiques, permettant d'investiguer la mémoire et la capacité d'apprentissage de l'abeille, les odeurs qu'elle discrimine etc.
PNEC	Predicted No Effect Concentration = la plus haute concentration à laquelle aucun effet n'aura vraisemblablement lieu, établie sur la base de tests sublétaux (il s'agit de la concentration juste inférieure à la concentration la plus basse ayant produit un effet)

Introduction

L'abeille.

1. Le contexte: les mortalités anormales dans les ruchers.

Les abeilles sont, comme tout autre animal, sujettes aux épizooties. C'est ainsi que, au début du XXème siècle, les ruchers européens ont été dévastés par l'acariose ; un épisode de pertes qui a été riche de conséquences, puisqu'il a entraîné les recherches qui ont débouché sur l'identification de l'agent pathogène *Acarapis woodi*, et sur un développement important de la sélection en apiculture (création de l'abeille dite de Buckfast par le Frère Adam, issu de cette abbaye).

Après la seconde guerre mondiale, le développement des produits phytosanitaires s'accompagne d'incidents dans les ruchers. Par suite de ceux-ci, l'abeille se voit peu à peu dotée d'une protection légale, et les substances les plus dangereuses pour elles sont interdites d'emploi pendant la floraison. Une fois ce cadre légal mis en place, les incidents qui ont eu lieu en dépit de celui-ci ont été attribués, le plus souvent en tous cas, à un mésusage du produit ; il s'agissait alors d'intoxications aiguës, caractérisées par un tapis d'abeilles mortes devant la ruche ou sur son plancher, souvent accompagnés de signes d'intoxication chez les butineuses survivante.

1.1. Le premier épisode de *disappearing disease*

A la fin des années '70, un nouvel épisode de pertes à lieu, notamment en France et aux USA. Les ruches se dépeuplent, sans que puissent être observées d'abeilles intoxiquées ou de mortalités anormales. On parlera de la « maladie des abeilles qui disparaissent » (*disappearing disease*). L'origine exacte du trouble est controversé ; aux Etats-Unis, le problème est réputé lié à des circonstances météorologiques ayant entrainé des carences alimentaires[1] ; en France, pour certains l'origine doit être rapprochée de celle décrite aux USA, mais aux yeux de beaucoup d'apiculteurs et de certains scientifiques, cet épisode est lié à l'apparition sur le marché de la deltaméthrine (c'est « l'affaire Decis »)[2]. Comme on le verra dans le rapport relatif à cette molécule, la deltaméthrine est en effet capable de désorienter les abeilles ; en outre, les abeilles empoisonnées aux pyréthrinoïdes sont réputées avoir tendance, non à rentrer à la ruche, mais à s'accrocher dans la végétation environnante pour y mourir, de sorte que les abeilles mortes ne sont pas retrouvées à l'entrée de la ruche[3] (on verra, dans la partie portant sur les pyréthrinoïdes, que c'est effectivement le cas). En France la deltaméthrine n'en a pas moins obtenu une autorisation « pleine fleurs » (le produit pouvait être appliqué pendant la floraison) en 1984, année qui vit dans les ruchers des dégâts aussi importants que ceux des trois années précédentes[4]. Cette autorisation est toujours valable actuellement (pour le Decis Expert[5] par exemple) quoique le produit soit assorti de la mention obligatoire « dangereux pour les abeilles ». Cette controverse a contribué à créer, en France, un climat conflictuel entre autour de la question du risque des pesticides pour les abeilles.

---

[1] Voir Wilson WT & Menapace DM, 1979 : Etude de la Maladie de la Disparition aux USA, American Bee Journal, Février / mars 1979, sur le site Apiservices : http://www.beekeeping.com/spmf/sapmp/maladie_disparition_usa.htm

[2] Voir notamment l'intervention de Joël Schiro, président du Syndicat des producteurs de miel de France, à la journée scientifique organisée par l'AFSSA à Maisons-Alfort le 10 septembre 2002

[3] Source : Luc Belzunces, exposé au cours de perfectionnement du CARI, 26 février 2011

[4] Source : Michel Cardinaux, 1995 : Les hommes et l'abeille, L'âge d'homme éd., p.170

[5] Voir le site E-phy : http://e-phy.agriculture.gouv.fr/

1.2. La seconde vague de mortalités

C'est dans ce contexte que survient l' »affaire Gaucho », dans le Sud-Ouest de la France, au début des années '90 (1992-1993) : des apiculteurs qui ont mis leurs ruches en transhumance sur tournesol les voient s'effondrer en quelques jours. Cette époque coïncide avec la mise sur le marché d'insecticides systémiques appliqués en traitement de semences, sur tournesol notamment. Une nouvelle controverse s'ensuit, les apiculteurs étant persuadés que ces insecticides sont à l'origine des pertes qu'ils subissent, les compagnies phytopharmaceutiques rejetant fermement cette hypothèse.

D'abord considéré comme strictement français, le problème des mortalités ne cessera ensuite de prendre de l'ampleur et de s'étendre, sans qu'il soit possible de savoir si les phénomènes constatés d'une région à l'autre du monde sont de la même nature et (ou) sont liés entre eux. Aujourd'hui, des mortalités anormales et importantes d'abeilles (jusque 40% de colonies perdues) sont décrites dans toute l'Europe de l'ouest et dans la plupart des pays d'Europe de l'est ; en Amérique du Nord (Canada-USA) ; en Chine et au Japon[6], en Egypte (UNEP 2010), en Uruguay[7]… Tous les continents sont touchés, et en Europe, la plupart des pays.

1.2.1. Les incidents liés aux poussières de semis

Ces mortalités ont pris la forme d'incidents aigus en Italie, en Allemagne et en Slovénie. En Italie, ces incidents ont eu lieu en 2007 et en 2008 : plusieurs dizaines de milliers de ruches ont péri à la période du semis de maïs, soit vers avril, dans la plaine padane, où sont cultivés environ 1 100 000 ha de maïs (Bortolotti *et al.* 2009). Des analyses réalisés par les services vétérinaires de différentes régions d'Italie (Lombardie, Vénétie, Piémont…) ont révélé la présence de néonicotinoïdes (clothianidine, de thiamethoxam et plus accessoirement imidacloprid) dans les abeilles mortes et dans le pollen, en quantités largement suffisantes pour expliquer la mort des butineuses. Suite à ces incidents, l'usage des néonicotinoïdes et du fipronil en traitement de semences a été suspendu en Italie sur cultures mellifères et/ou pollinifères (décret du 17 septembre 2008, renouvelé tous les ans depuis).

En Allemagne, environ 12 000 colonies d'abeilles ont péri fin avril – début mai 2008, dans les Länder de Bavière et du Bade-Wüttemberg (Forster 2009). Les analyses ont été réalisées au Julius-Kühn Institut avec les mêmes résultats qu'en Italie (à ceci près que le fipronil était aussi retrouvé dans les échantillons provenant des ruches dépéries) (Bischoff 2010). Les apiculteurs ont été invités à déclarer leurs ruches mortes et à sortir tous les cadres contenant du pollen, vu le niveau de contamination de celui-ci. Tout comme en Italie, ces mortalités étaient en relation directe avec le semis de maïs. Tout comme en Italie, l'usage des néonicotinoïdes et du fipronil en traitement de semences sur cultures mellifères et/ou pollinifères a été suspendu en Allemagne et l'est encore à ce jour.

Des incidents similaires ont eu lieu en Slovénie de 2008 à 2011 ; en 2011 ce pays a, à son tour, suspendu l'usage en traitement de semence des molécules incriminées[8].

Le mécanisme par lequel l'abeille est empoisonnée est à présent éclairci : c'est en traversant en vol l'air contenant des particules que l'abeille entre en contact avec le toxique. Les poussières, y compris les fines, restent en effet facilement accrochées sur le

---

[6] Voir notamment Tanigushi et al. 2012, publication à laquelle nous n'avons pu accéder mais dont l'abstract est disponible sur le Net : http://www.dbpia.co.kr/Journal/ArticleDetail/2163286

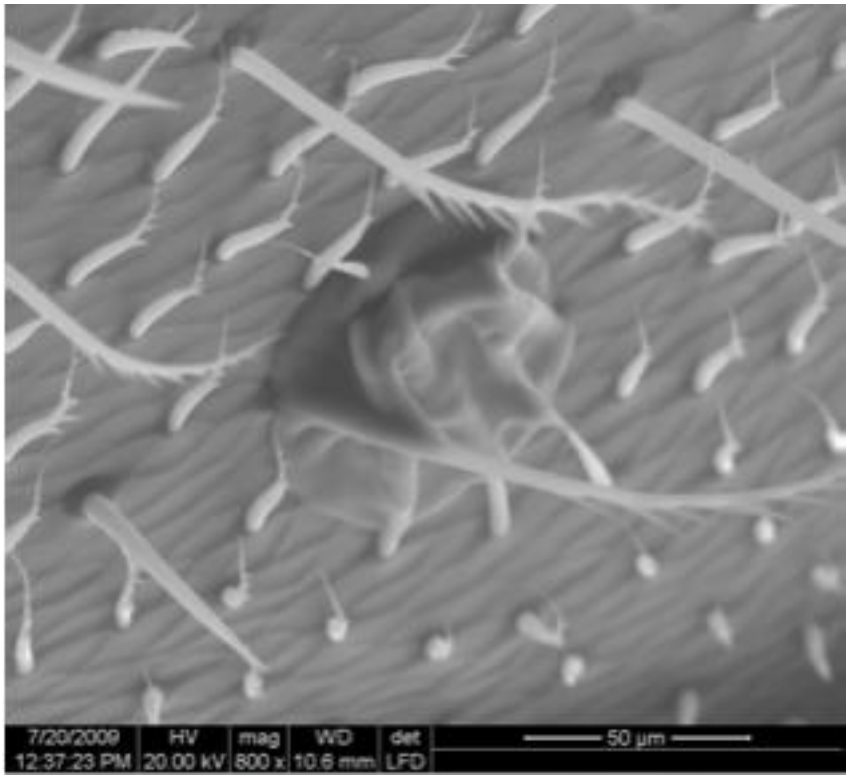
[7] Source : Mendoza Y : informe : *Estudio de casos de mortandad de colonias de abejas donde se encontro fipronil en las colmenas*

[8] Pas de publication de l'étude de monitoring à notre connaissance. Les seules sources écrites sont des commentaires d'actualité, par exemple http://www.siol.net/slovenija/znanost_in_okolje/2009/04/za_pomor_cebel_v_podovi_najverjetneje_kriv_fipromil.aspx

corps de l'abeille qui est fait, avec ses poils branchus, pour ramasser les grains de pollen dont la taille est de l'ordre de la dizaine de microns généralement, soit de la même taille que les fines en question (Girolami *et al.* 2011). Ces poussières sont d'autant plus toxiques, que le degré d'humidité de l'air est élevé ; l'air modifie la forme des micro-particules qui s'aplatissent contre le tégument de l'abeille, permettant au toxique de pénétrer le tégument (Tapparo *et al.* 2012).

Ce mécanisme expliquerait aussi les concentrations élevées en toxiques retrouvés dans le pollen lors des incidents dans le Bade-Wüttemberg et en Italie : l'abeille récolte en effet le pollen en se brossant le corps ; elle ramasse ainsi le toxique en même temps que les grains de pollen, avec pour conséquence l'empoisonnement des nourrices et du couvain.

(photo ci-contre : une particule issue de l'enrobage est collée au tégument de l'abdomen de l'abeille. Source : Tapparo *et al.* 2012)



Les incidents liés aux poussières de semis ont eu pour conséquence que, en 2010, la Commission européenne a modifié les directives d'inclusion, à l'annexe I de la directive 91/414/CEE, par la directive 2010/21/UE. Cette dernière prescrit :

- que l'enrobage des semences doit être fait dans des installations professionnelles
- que le semoir doit être équipé en telle manière qu'il assure *un degré élevé d'incorporation dans le sol ainsi que la réduction au minimum des pertes et des émissions de poussières doit être utilise*
- que l'étiquette des sacs de semences mentionne que les semences sont traitées et indique les mesures de réduction des risques prévues par l'autorisation
- que les conditions d'autorisation soient revues, le cas échéant, pour protéger les abeilles
- que *des programmes de surveillance soient mis en place dans le but de vérifier l'exposition réelle des abeilles* [aux substances concernées] *dans les zones largement utilisées par les abeilles pour butiner ou par les apiculteurs, lorsque cela se justifie*.

Les Etats membres, dont la Belgique, ont mis en œuvre cette directive en imposant des déflecteurs sur les semoirs pour le semis de maïs traité (cf. par exemple le communiqué de presse du SPF Santé publique, 22/01/2010) ; des études, menées notamment par les écotoxicologues de Bayer CropScience, montrent en effet que ce système est efficace (Nikolakis *et al.* 2009).

Cet avis n'est toutefois pas partagé par toute la communauté scientifique. Selon le rapport italien APENET (APENET 2009), qui a mesuré l'impact des déflecteurs lors du semis de semences traitées avec les 4 matières actives insecticides utilisées en traitement de semences, l'effet des déflecteurs est variable selon les molécules testées mais conduit à accroître la dispersion des poussières à grande distance. Ce rapport conclut comme suit :

Nos données suggèrent que, malgré que le système impliquant l'application d'un déflecteur à deux tuyaux pour l'abattement des poussières permette une réduction notablement variable dans la concentration des poussières au niveau du sol, il contribue à une plus grande dispersion des poussières dans l'air, avec une dérive se répandant sur de plus grandes distances et pour cette raison un accroissement de la probabilité de contact avec les abeilles en vol et avec les ruches situées dans les environs (p. 27 du rapport).

Cette conclusion est confirmée par l'étude (Tapparo *et al*. 2012) qui a analysé les résidus aux abords de champs traités et non traités, avec des semoirs pneumatiques ordinaires ou équipés de déflecteurs. L'étude conclut : *les résultats analytiques en regard des facteurs d'émissions, de la concentration de l'air en insecticide autour du semoir et de la contamination subséquente des abeilles, révèlent qu'aucun des types testés d'enrobages de semences (y compris les plus récemment proposés) ne prévient la dispersion de larges quantités de particules fines contenant l'insecticide, produisant une exposition létale des abeilles en vol. En outre, les modifications de la sortie d'air des semoirs adoptés jusqu'à ce jour n'ont que des effets limités, à la fois sur le facteur d'émissions et sur la contamination effective des abeilles*.

1.2.2. Les mortalités hivernales

Les incidents décrits ci-dessus son ponctuels et bien marqués : abeilles mortes devant la ruche, sortie de larves mortes par les abeilles restantes… La responsabilité des molécules (néonicotinoïdes et fipronil) a été établie, ces insecticides ayant été retrouvés en abondance dans les échantillons d'abeilles et de pollen analysés.

Ces incidents ne constituent toutefois pas le phénomène le plus marquant des mortalités anormales, dont la forme la plus souvent décrite est la disparition des abeilles, généralement en hiver. Celles-ci quittent la ruche en n'y laissant que le couvain et les réserves, et parfois la reine, entourée d'une petite boule d'abeilles, voire totalement seule. D'autres phénomènes y sont associés, notamment des difficultés de remérage et une fréquence accrue des supersédures[9], qui posent de gros problèmes aux éleveurs de reines. Toutefois, en dépit de budgets importants affectés à la problématique de la perte des colonies d'abeilles[10], l'étude épidémiologique nécessaire à la caractérisation des phénomènes n'a jamais été réalisée ; il est donc difficile de savoir si ceux constatés dans les différentes régions peuvent être considérés comme semblables, et rapportés à une même cause ; tout comme il est impossible à ce jour de cartographier les pertes et leur nature, et donc de vérifier une éventuelle corrélation de celles-ci avec les activités agricoles et sylvicoles, exercice indispensable si l'on souhaite trancher la controverse entourant ces mortalités.

Car la controverse, née en France comme on l'a vu, gagne les pays et les continents en même temps que les mortalités. Les apiculteurs sont nombreux (probablement majoritaires, et largement) à considérer que les pesticides, et singulièrement les insecticides en traitement de semences, jouent un rôle de premier plan dans les pertes. Toutefois, à l'exception des suspensions qui ont été prononcées dans les pays où ont eu lieu les incidents liés aux poussières de semis, les autorités publiques refusent d'agir à l'encontre des autorisations délivrées pour ces pesticides, et en dépit des débats qui les

[9] On appelle remérage le fait de donner une nouvelle reine à une colonie. La supersédure est la coexistence de deux reines dans la colonie.
[10] Notamment le projet du programme européen COST intitulé CoLoss pour « Colony Losses » : voir le site du projet : http://www.coloss.org

entourent la Commission a délivré les directives d'inclusion aux quatre substances concernées entre juillet 2006 (clothianidine) et décembre 2008 (imidaclopride).

La controverse est toujours pendante à ce jour, d'autant plus que l'évaluation de ces molécules, obligatoires avant leur mise sur le marché comme produit phytosanitaire, ne peut être considérée comme valide dans la mesure où elle s'est faite selon un schéma d'évaluation inadapté aux nouvelles voies d'exposition de l'abeille que ces insecticides supposent (Alix & Vergnet 2007 ; EFSA PPR 2012). En effet le mode d'exposition de l'abeille aux semences traitées diffère fondamentalement du mode d'exposition par pulvérisation. Les insecticides systémiques en traitement de semences contaminent le nectar, le pollen (e.a. Schnmuck *et al*. 2001) et les eaux d'exsudation des plantes traitées (Girolami *et al*. 2009), ainsi que des adventices qui voisinent les champs traités (Krupke *et al*. 2012) ; l'abeille y est donc exposée de façon chronique ; et le schéma d'évaluation des risques pour abeille ne prévoit toujours que la mesure de la toxicité aiguë, laquelle peut varier largement par rapport à la toxicité chronique, selon la substance considérée. Le Conseil d'Etat français a d'ailleurs suspendu l'autorisation du Gaucho maïs pour un problème lié aux tests sur les abeilles dans les dossiers d'autorisation[11] : des tests sur les larves sont manquants. Cet arrêt est à l'origine d'une révision du schéma d'évaluation, révision elle-même sujette à controverses, car le schéma proposé par l'Organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes (EPPO)[12] a été contesté par la Coordination apicole européenne, un débat qui s'est soldé par la décision de la Commission de confier à l'EFSA un commentaire des travaux existants et une proposition de schéma nouveau. L'EFSA a rendu son avis en juin 2012 (EFSA PPR 2012); cet avis est largement favorable aux thèses soutenues par le monde apicole, notamment en ce qu'il met l'accent sur l'importance toxicologique des effets chroniques létaux et sublétaux des contaminants sur l'abeille, et sur la nécessité d'une prise en compte effective de ces effets dans les schémas d'évaluation des substances et produits phytosanitaires.

1.3. Les causes possibles

En ce qui concerne l'étiologie des mortalités, de nombreuses hypothèses ont été émises, concernant notamment les maladies. Notamment, en Espagne une équipe scientifique identifie un nouveau microsporidien de l'abeille, *Nosema ceranae*, parent d'un pathogène connu, *Nosema apis*. Selon cette équipe, les pertes de colonies en Espagne sont corrélées avec la présence de N ceranae (Higes *et al*. 2006). Toutefois des recherches ultérieures montreront que ce parasite est un opportuniste présent en fait depuis longtemps chez l'abeille ; il n'était précédemment pas distingué de son cousin *N. apis*, distinction qu'on a pu opérer grâce aux techniques d'identification génétiques (PCR), ce qui explique sa « découverte » (Colin *et al*. 2008 ; Chen *et al*. 2008 ; Invernizzi *et al*. 2009). Aux USA, c'est un virus qui est pointé du doigt, le virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV) (Cox-Foster *et al*. 2007) ; toutefois, des chercheurs du département de recherches de l'USDA montrent rapidement que le virus est présent sur le territoire américain de longue date (Chen & Evans 2007). Un iridovirus fournit lui aussi un coupable potentiel (Bromenshenk *et al*. 2010), hypothèse quasiment aussitôt démentie (Tokarz *et al*. 2011). L'abeille fait recette, et la science n'échappe pas aux effets d'annonce ; mais le « revolver fumant » n'est toujours pas découvert, et de nombreux scientifiques se rallient à l'hypothèse d'une origine multifactorielle (Watanabe 2008). La question de l'implication des contaminants dans les pertes est toujours pendante actuellement. D'abondantes études ont montré les effets sublétaux des insecticides, notamment ceux utilisés en traitement de semences ;

[11] Section du contentieux sur la rapport de la 3ème sous-section - Séance du 24 février 2006 Lecture du 28 avril 2006, N° 269103,269109,269686,269722,269959, 270004 : ASSOCIATION GENERALE DES PRODUCTEURS DE MAI□S et autres.

[12] L'EPPO est l'expert usuel de la Commission pour l'évaluation du risque des pesticides pour les abeilles, et pour d'autres catégories de points à évaluer d'ailleurs. L'EPPO est l'auteur des lignes-guides qui accompagnent le schéma d'évaluation du risque des pesticides pour les abeilles fixé par les annexes de la directive 91/414/CEE,

ces effets sublétaux sont capables d'expliquer à eux seuls les phénomènes constatés (très nombreuses études ; pour une méta-analyse, voir par exemple celle de J. Cresswell (Cresswell 2010) sur l'imidaclopride). Il reste que la multiplicité des facteurs agressant l'abeille (contaminations, relative pauvreté des sources de nourriture) est réelle, principalement dans les zones où l'agriculture est intensive. S'y ajoute le problème de la varroose. Cette maladie peut être contrôlée par l'usage de médicaments adaptés, mais ceux-ci sont peu diversifiés, l'abeille étant une « espèce mineure » qui dans la plupart des pays n'offre à l'industrie des médicaments vétérinaires qu'un marché à la fois spécifique et restreint, et donc peu attractif.

Varroa, contaminants, moindre richesse nutritive des pollens récoltés : tous ces facteurs de stress sont susceptibles de s'additionner pour entrainer un raccourcissement de l'espérance de vie de l'abeille, une conséquence qui intéresse l'individu mais est capable de mettre en jeu la vie de la colonie entière, car celle-ci n'arrive plus à renouveler ses générations si les abeilles n'ont pas une longévité suffisante (Khoury *et al.* 2011, voir à ce propos le point relatif à la biologie de l'abeille ci-dessous).

Le fait est que, actuellement, l'apiculture est en danger, et avec elle les services de pollinisation auxquels l'abeille mellifère est nécessaire (entre autres les cultures à fleurs, car l'abeille mellifère est la seule à développer des populations suffisamment puissantes pour polliniser une floraison large et abondante, un champ de colza par exemple (Rader *et al.* 2009)). Quelle que soit l'origine du trouble, celui-ci a néanmoins un caractère environnemental indéniable (par sa distribution géographiques, par les hypothèses causales que l'on peut formuler) et des voix de plus en plus nombreuses s'élèvent pour demander une évolution radicale du modèle agricole, le modèle dominant actuellement étant pointé du doigt pour avoir le double effet d'appauvrir le régime alimentaire des pollinisateurs et de charger le milieu en composés toxiques (voir par exemple Anderson *et al.* 2011, Krupke *et al.* 2012).

2. L'abeille, quelques éléments de biologie

2.1. Biologie générale

L'abeille constitue des colonies d'une force remarquable, comptant 15-20 000 individus en hiver et se développant au printemps pour atteindre plus de 50 000 individus en pleine saison. Elle est, comme d'autres pollinisateurs, totalement symbiote des fleurs dont elle se nourrit quasi exclusivement, le nectar lui fournissant son aliment énergétique, le pollen sa source de protéines et de vitamines. Le miellat des pucerons, voire les fruits mûrs en fin d'été, lui fournissent d'autres sources de sucre, mais celles-ci ne sont pas indispensables. Comprendre cette symbiose est essentielle car bon nombre des caractéristiques de l'abeille y sont liées, qu'il s'agisse des caractéristiques physiques (les brosses à pollen, les pois branchus…) ou comportementales (les capacités que l'abeille met en œuvre pour s'orienter dans la nature et reconnaître les floraisons intéressantes…).

Le cycle saisonnier de la colonie

Le cycle de vie de l'abeille mellifère dépend étroitement des saisons, tout comme ses caractéristiques physiologiques. Les abeilles d'hiver vivent bien plus longtemps que les abeilles d'été (7-8 mois l'hiver contre 6 semaines l'été), une différence qui s'explique par le fait que ces abeilles diffèrent légèrement par leur constitution (l'abeille d'hiver dispose notamment de corps gras et de réserves protéinées plus importants, et ses glandes hypopharyngiennes sont plus développées (Otis *et al.* 2004 ; Crailsheim 1990 ; Mattila *et al.* 2001)) et surtout par le fait que les travaux des unes et des autres sont fondamentalement différents. Les abeilles nées au printemps ou en été seront (en gros) tout à tour nettoyeuses, nourrices, magasinières et/ou gardiennes puis butineuses. Leur charge de travail est donc plus lourde que celle des abeilles d'hiver, dont la seule tâche

importante est la production de chaleur. Or, comme tous les insectes, l'abeille voit sa vie abrégée par la dépense énergétique que supposent les tâches qu'elle doit mener à bien (Wolf *et al.* 1989). Ce sont donc les travaux qu'elle assume, et en particulier les vols de butinage, qui déterminent la longévité de l'abeille (Schmid-Hempel & Wolf 1988); en fait, abeilles d'hiver comme abeilles d'été mourront épuisées après avoir nourri un certain nombre de larves, et parcouru un certain kilométrage en vol (Winston 1987).

L'hiver les abeilles constituent la grappe : elles se rassemblent « en boule » au milieu de la ruche (une boule qui est en fait coupée par les rayons de la ruche). L'abeille tombe en collapsus lorsque la température descend sous les 7°C environ. Au sein de la grappe, des abeilles chauffeuses[13] produisent assez de chaleur pour maintenir des abeilles du bord de la grappe à une température supérieure à celle du collapsus – sans plus. La température de la grappe n'est donc pas constante ; elle varie en fonction inverse delà température extérieure (Fahrenholz et al. 1989). Ces abeilles constituant l'extérieur de la grappe, serrées les unes contre les autres, têtes vers l'intérieur de la grappe, constituent un « manteau » isolant dont la température est nettement inférieure à celle du cœur de grappe où se trouvent les abeilles chauffeuses (Owens 1971, Stabentheiner et al. 2003).

Au printemps, dès que la température atteint 11-12°C, la grappe se relâche ; elle est totalement disloquée vers 15°C, et les abeilles sont alors au travail. Bien avant que les températures extérieures n'atteignent ce niveau, la reine a repris la ponte. Celle-ci s'accélère avec les premières rentrées de pollen (le noisetier et surtout le saule Marsault) et va jusqu'à 2000 œufs par jour (son propre poids) en pleine saison (mai – juin). Les butineuses, à ce moment, sont plus de 10 000 par ruche, parcourant les alentours pour trouver les sources de nourriture les plus intéressantes, dont elles se communiquent la localisation au moyen de la danse. Le rayon de butinage a fait l'objet de nombreuses études ; en fait, ce rayon n'a pas de limite bien définie : les abeilles butinent à la distance qu'il faut pour récolter les ressources qu'elles estiment suffisantes. Dans un environnement suffisamment riche, celui-ci est généralement de quelques centaines de mètres ; mais il peut aller jusqu'à plus de 10km en cas de nécessité, le rayon maximum enregistré à ce jour étant de 13 km (Pahl *et al.* 2011).

C'est lorsque la ruche atteint son plein développement, c'est à dire au milieu du printemps, et jusqu'au milieu de l'été, que la colonie se reproduit. Les abeilles, relativement privées de phéromones royales par l'encombrement de la ruche, entament alors la construction de cellules royales, comportement qui est chez elle instinctif mais inhibé par les phéromones de la reine. Lorsque la première cellule royale est operculée, la reine en place s'envole, suivie d'une grande partie de la colonie, laissant le nid et les réserves à la future reine. Celle-ci, encore vierge, peut à son tour partir en essaimage et laisser le nid à une suivante. Si la force de la colonie ne permet pas un nouvel essaimage, la première reine vierge née restera à la ruche, tuera ses sœurs au berceau, et partira en vol de fécondation où elle sera couverte par un nombre de mâles variant ordinairement entre 15 et 20. Ces mâles sont haploïdes et la diversité génétique de l'abeille mellifère repose sur la polyandrie de la reine ; la diversité génétique d'une colonie repose quant à elle sur la diversité génétique des mâles que sa reine pourra rencontrer lors du vol de fécondation (voir par exemple Winston *et al.* 1987).

Vers la fin de l'été la ponte de la reine ralentit et la colonie peu à peu décroît. Le couvain élevé à ce moment donnera naissance aux abeilles d'hiver, et la boucle est bouclée.

[13] L'abeille produit de la chaleur au niveau du thorax par contraction tétanique de ses muscles de vol, voir par exemple Kleinhenz et al. 2003

La régulation de la colonie d'abeilles

La colonie adapte constamment son niveau d'activité aux ressources extérieures par le biais de comportements modulateurs (en particulier le comportement de secouement, par lequel l'abeille secoueuse réajuste le niveau d'activité de celle qu'elle secoue en fonction de l'importance de la récolte (revu par Schneider & Lewis 2004)).

Un second type de régulation est produit par le jeu des phéromones. Toutes les catégories d'abeilles en produisent (les mâles, les ouvrières, les reines, les larves d'ouvrières, les larves de mâles) et ces phéromones, et surtout le proportions relatives des unes et des autres, pilotent largement l'équilibre de la colonie. Par exemple, une phéromone règle constamment la proportion des butineuses et des abeilles d'intérieur : produite par les butineuses, elle maintient les abeilles d'intérieur dans leur tâche de nourrice ou de magasinière (Leoncini *et al.* 2004). En l'absence de cette phéromone, ces abeilles d'intérieur deviendront butineuses à leur tour. De même, en l'absence de couvain mâle et en présence d'un abondant couvain d'ouvrières, les abeilles construiront des cellules de mâles pour que la reine y ponde des mâles. Dès que les phéromones émanant du couvain mâle atteignent une certaine proportion par rapport au couvain d'ouvrières, les abeilles cesseront d'élever des mâles, etc.

Le comportement individuel de l'abeille est le fruit de schémas innés et d'une histoire personnelle : un comportement donné est déclenché par un stimulus (par exemple : le comportement de ventilation est déclenché par le taux de CO_2 et/ou la température dans le nid), et ce sont les abeilles dont le seuil de perception du stimulus est le plus bas qui d'abord engagent la tâche. Si elles n'y suffisent pas, le stimulus va s'accroître et les abeilles moins sensibles vont rejoindre leurs compagnes déjà occupées. Si les premières engagées y suffisent, elles seront les seules, dans la colonie, à l'avoir exécutée. Il y a donc une forme de spécialisation des abeilles d'une colonie, qui est encore accentuée par ceci, que le fait de remplir une tâche diminue chez l'insecte le seuil de sensibilité au stimulus. Ce seuil est donc bien influencé tout à la fois par la génétique et par les nécessités que l'abeille aura rencontrées au cours de sa vie (Theraulaz *et al.* 1998). En conséquence, si certaines tâches sont remplies par une majorité d'abeille (les soins aux larves, le butinage), seule une minorité d'entre elles s'occuperont travaux nécessitant un moindre nombre d'ouvrières, (s'occuperont des soins à la reine, seront gardiennes ou éboueuses, etc.).

L'abeille réagit donc toujours à des stimuli locaux, qu'elle ressent à la place où elle se trouve. La cohérence comportementale de la colonie vient de ce que les abeilles réagissent à ces stimuli de façon identique, à ceci près que le degré du stimulus déclenchant la réaction varie selon la lignée paternelle, et selon l'individu ; mais la nature de la réaction est bien la même. Ceci permet de comprendre que, si la ruche est un monde bien organisé, aucune intelligence individuelle ou centralisée ne préside à cette organisation : la colonie d'abeilles est entièrement autorégulée (voir par exemple Camazine 1991 pour l'auto-organisation du cadre). Une colonie d'abeilles adapte donc constamment son fonctionnement à ses ressources propres et aux ressources extérieures ; mais personne n'y a ni le recul, ni la capacité d'effectuer l'analyse et de prendre les décisions nécessaires à redresser une situation qui dérape. En conséquence, la colonie se défend mal contre les éléments perturbants artificiels, extérieurs à l'environnement au sein duquel elle a évolué. Face à un tel évènement la colonie tentera toujours de compenser, la compensation puise dans les réserves de la colonie et ne peut donc se faire que jusqu'à un certain point ; au-delà apparaissent des effets négatifs en boule de neige (décompensation). Ainsi en va-t-il de la perte des butineuses par exemple, qui a pour conséquence, non seulement que la colonie perd des ressources, mais aussi qu'elle dispose de moins de nourrices pour élever de nouvelles abeilles ; un phénomène qui peut aller jusqu'à la disparition complète de la colonie (Khoury *et al.* 2011) comme on le verra au point suivant.

Cognition

Si le cerveau de l'abeille est infiniment plus petit que celui des mammifères (1 mm^3, 960 000 neurones (Giurfa 2003)), son comportement n'en est pas moins étonnamment élaboré. L'abeille est capable d'apprentissage (elle peut apprendre à associer un stimulus visuel, tactile ou odorant à une récompense sucrée et le reconnaît ensuite, au besoin d'un jour à l'autre). Elle peut extraire des informations mises en mémoire pour les comparer à celles qu'elle réceptionne pour en tirer une prise de décision. Entraînée à aller chercher du sucre dans un nourrisseur situé derrière un signe qui est le même que celui qu'elle rencontre en entrant dans le dispositif expérimental, elle ira chercher le nourrisseur derrière ce signe quel qu'il soit concrètement: elle est donc capable de forger le concept de « même », indépendamment du support matériel qu'est le signe (des cercles de couleur, des rayures en noir et blanc…) (Giurfa *et al*. 2001).

Pour s'orienter, elle doit faire l'apprentissage de la course du soleil car c'est par rapport à ce repère mobile qu'est le soleil qu'elle définit la direction des sources de nourriture ; et elle doit pouvoir relier les différentes positions du soleil aux éléments du paysage. En effet, c'est par la polarisation des rayons UV émis par le ciel que l'abeille repère la direction du soleil avec précision ; les danses par lesquelles les abeilles se communiquent la position des sources de nourriture indiquent toujours ces directions (Frisch K v, 1964). Mais l'abeille intègre aussi les éléments du paysage (revu par Menzel *et al*. 2006). Elle doit pouvoir retrouver ses sources de nourriture par temps couvert, alors que les nuages l'empêchent, et de repérer le soleil lui-même, et de réceptionner les UV solaires qui sont coupés par la couche nuageuse. L'abeille qui reçoit le message d'une danseuse doit donc pouvoir « traduire » en termes d'éléments paysagers le message que la danseuse lui transmet en termes de directions ; et on peut montrer que l'abeille est effectivement capable de faire ce lien (Towne & Moscrip 2008). Elle fait l'apprentissage de la course du soleil au cours de ses vols d'orientation, qu'elle met également à profit pour repérer les éléments significatifs du paysage et la direction de sa ruche par rapport à ceux-ci (Dyer 1987). Elle conserve ces éléments en mémoire tant que la ruche n'est pas déplacée ; l'essaimage de sa colonie, le déplacement important de la ruche opéré par l'apiculteur, l'amènent à « remettre son compteur à zéro », et à refaire de nouveaux vols d'orientation pour se recréer un nouvel ensemble de repères spatiaux.

Défense contre les maladies

La plupart des maladies de l'abeille sont le fait de pathogènes occasionnels et opportunistes, co-évolués avec l'abeille (Anderson *et al*. 2012). La colonie d'abeille se défend contre les maladies via le système individuel de défense de l'insecte (qui inclut des cellules et des protéines sanguines) et surtout via des moyens de défense sociaux (« l'immunité sociale »), en fait des comportements de l'abeille qui ont pour effet de maintenir une bonne hygiène du nid et des abeilles elles-mêmes. Ceux-ci vont des comportements de nettoyage (individuel ou entre congénères) à l'organisation du nid (les plus fragiles à l'intérieur, les insectes appelés à voler hors de la ruche à l'extérieur du nid) et à la préservation des réserves : l'abeille sécrète ainsi une enzyme, la glucose-oxydase, qui en présence de glucose forme du peroxyde d'hydrogène, dont l'action désinfectante préserve le miel de la fermentation. Les moyens de défense incluent aussi des comportements curatifs : l'abeille repère à l'odeur et extrait les larves malades. Ce comportement hygiénique est inégal et tient notamment à la génétique de l'abeille. Des recherches sont en cours pour sélectionner des lignées d'abeilles hygiéniques dans le cadre de la lutte contre les maladies (revu par Evans & Spivak 2009 et Wilson-Rich *et al*. 2009)

Tout ce qui est dit précédemment montre l'importance du comportement de l'abeille dans le développement, la survie et la préservation de la colonie. On comprend dès lors qu'un contaminant, s'il a des propriétés neurotoxiques, peut mettre à néant une colonie d'abeilles à des doses bien inférieures à celles qui sont mortelles pour l'insecte. Ceci

constitue l'une des prémisses importantes de la toxicologie de l'abeille, et met en lumière l'importance de l'étude des effets sublétaux en toxicologie de l'abeille.

2.2. Quelques éléments de biologie pertinents en regard de la toxicologie de l'abeille

Outre ce qui a été dit ci-dessus, plusieurs notions relatives à la biologie de l'abeille sont indispensables à la compréhension de la manière dont un toxique peut agir sur elle. Nous les résumons brièvement ci-dessous.

2.2.1. Complexité des mécanismes toxicologiques

Les insecticides sont généralement des neurotoxiques et c'est à ces propriétés neurotoxiques que leur mécanisme d'action est généralement relié. Toutefois, d'autres mécanismes toxicologiques peuvent jouer à côté de ces mécanismes « principaux ». C'est ainsi par exemple que, à côté de leurs propriétés neurotoxiques, les pyréthrinoïdes ont également une action réprotoxique chez les vertébrés, via des mécanismes indépendants de leur neurotoxicité (revu par Belzunces *et al.* 2012).

Les mécanismes généraux de la neurotoxicité sont communs à une même famille de produits : les carbamates et les organophosphorés sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, les néonicotinoïdes des agonistes de l'acétylcholine, les phénylpyrazoles des antagonistes du GABA… Toutefois à une échelle plus fine les différentes substances d'une même famille n'ont pas forcément le même effet ; par exemple, chez l'abeille, certaines pyréthrinoïdes (deltaméthrine) affectent le réflexe conditionné d'extension de la langue tandis que d'autres substances de la même famille n'ont pas cet effet, à des doses pourtant semblables (*ibid.*). Les effets toxiques sont donc à envisager substance par substance.

Enfin les mécanismes physiologiques mis en jeu par une même substance peuvent différer fortement selon la dose, avec pour conséquence que la relation dose-effet n'est pas toujours monotone, et qu'une même substance peut avoir à dose élevée des effets inverses de ceux qu'elle a à faible dose – ainsi en va-t-il par exemple de l'imidaclopide qui rend l'abeille apathique à dose élevée mais a un effet dynamisant à très faible dose (voir le point relatif à cette molécule).

2.2.2. Quantités ingérées

La quantité d'un contaminant donné avec laquelle l'abeille est susceptible d'entrer en contact dépend de la concentration du nectar, de l'eau ou du pollen en ce contaminant, mais aussi des quantités d'eau, de nectar ou de pollen susceptible d'entrer en contact avec l'abeille. Or les quantités ingérées sont, en proportion, beaucoup plus importantes qu'elles ne le seraient chez un vertébré.

L'abeille ingère du nectar pour s'alimenter ; en laboratoire, une abeille qui n'a aucune activité consomme ainsi 33 – 35 μL de sirop par jour pour ses besoins personnels (Laurino *et al.* 2011 ; Decourtye *et al.* 2003 ; Decourtye *et al.* 2005). Mais cette consommation s'élève considérablement lorsque l'abeille est active. En effet le nectar n'est pas qu'un aliment pour l'abeille ; il est aussi son combustible de chauffe et son carburant de vol. L'abeille couve son couvain operculé (34 – 36°C) et doit maintenir pendant l'hiver, on l'a vu, une température suffisante au cœur de sa grappe hivernale pour que tous les individus puissent se maintenir à une température supérieure à celle pour laquelle les abeilles tombent en collapsus. Elle produit à cette fin de la chaleur en contractant ses muscles de vol, dont la consommation énergétique est considérable. C'est aussi l'énergie puisée dans le nectar qui lui permet de se maintenir en vol, avec une fréquence de battement d'ailes de 230 – 250 battements à la seconde. En conséquence, les chiffres de consommation de l'abeille en vol obtenus par respirométrie sont eux aussi considérables : Balderrama *et al.*

citent ainsi une consommation de 13 mg de sucrose (saccharose)/heure pour un vol de force moyenne (Balderrama *et al.* 1992). En trois heures de vol, une butineuse consomme ainsi son propre poids de nectar à 40% de sucre. Il est important de ne pas perdre de vue cette réalité dès lors que la quantité de toxique ingérée est en proportion de la quantité de nectar ingérée par l'abeille.

De même, l'eau n'est pas qu'une boisson pour l'abeille, elle est aussi un moyen de climatisation de la ruche pendant les périodes chaudes (Kühnholz & Seeley 1997). Les porteuses d'eau peuvent faire plusieurs allers-retours par jour en transportant la moitié de leur poids en eau. Même si l'eau est contaminée à très faible dose, l'abeille peut dans ce cas aussi se trouver exposée à une quantité de contaminant signifiante sur le plan toxicologique.

L'abeille n'ingère pas seulement ce qu'elle digère ; elle ingère également l'eau et le nectar qu'elle rapporte à la ruche (son panier à provisions fait partie de son milieu intérieur). Son jabot peut contenir jusqu'à 50 µL (le contenu moyen est estimé à 40 µL, Seeley 1984 *in* Robinson & Ratnieks 1987); elle peut ainsi en une seule charge transporter la moitié de son propre poids en nectar ou en eau. Les liquides régurgités ne sont pas digérés par l'abeille mais n'en sont pas moins en contact prolongé avec le jabot, et passent deux fois par l'œsophage de l'abeille.

(Photo ci-contre : dissection montrant le volume du jabot plein par rapport au corps de l'abeille. Source : Olofsson & Vásquez 2008)

La toxicité éventuelle résultant de ces contacts s'ajoute à celle des contaminants digérés par l'abeille. Il convient de ne pas perdre de vue cette réalité lorsqu'on apprécie la valeur toxicologique de la DL_{50} ; celle-ci ne tient en compte que la toxicité du nectar et du sirop digérés par l'abeille (car les lignes-guides prescrivent de donner le contaminant dans une quantité de sirop suffisamment petite pour que l'abeille la digère entièrement) mais néglige la toxicité liée à la part régurgitée par la butineuse ou la porteuse d'eau. Toutefois, cette voie d'exposition est limitée aux substance qui seraient absorbées au niveau du jabot ; ce n'est pas le cas de toutes, et certaines substances peuvent être transportées par l'abeille à des concentrations où elles entraineraient la mort si elles n'étaient régurgitées. C'est le cas du fipronil selon une étude de l'INRA (INRA 2003), où des abeilles butineuses ont été observées, transportant sans dommage une charge de sirop contaminé à une concentration normalement létale.

2.2.3. Mise en réserve, consommation différée et hivernage

Le pollen n'est jamais consommé immédiatement car il nécessite une fermentation lactique pour être pleinement digestible par l'abeille. Cette fermentation n'est complète qu'après une quinzaine de jours (Gilliam 1972) ; le pollen ainsi fermenté constitue le pain d'abeilles. Le nectar peut être consommé directement, et une partie l'est effectivement. Le nectar et le pollen dont la colonie n'a pas un besoin immédiat sont mis en réserve dans les rayons, sous forme de miel et de pain d'abeilles respectivement. La colonie consomme ces réserves lors des périodes pendant lesquelles la récolte est impossible, notamment en hiver. Les abeilles consomment ainsi couramment en avril du pollen et du miel mis en réserve en août, c'est à dire avec huit mois de décalage. Si ces réserves sont contaminées,

les effets de la contamination peuvent ne se faire sentir qu'au moment de la consommation, c'est à dire plusieurs mois après la contamination. Il est donc important que l'évaluation des molécules potentiellement toxiques inclue l'observation du devenir des colonies pendant et après l'hivernage.

En outre, comme déjà dit, les abeilles d'hiver ont une physiologie différente de celle des abeilles d'été ; il n'est donc pas évident que la sensibilité aux toxiques soit la même pour ces deux catégories d'abeilles.

2.2.4. La sensibilité de l'abeille aux contaminants

Les insectes détoxifient plus ou moins les xénobiotiques. Trois groupes d'enzymes de détoxification sont identifiées chez l'insecte : les monooxygénases dépendantes du cytochrome P450, les carboxylestérases et les glutathion-S-transférases. Ces enzymes sont codées par des gènes particuliers et la résistance des insectes aux pesticides dépend notamment du niveau d'expression de ces gènes (Johnson *et al*. 2006). Les deux derniers groupes sont utilisés comme biomarqueurs de la contamination par les pesticides chez les invertébrés en général (Hyne & Maher 2003) et chez l'abeille en particulier (Badiou-Bénéteau *et al*. 2012).

Des études du Consortium du génome, il apparaît que l'abeille a moins de gènes de détoxification que les autres insectes dont le génome a été décodé (l'Anophèle et la Drosophile) (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). La question de savoir si l'abeille est globalement plus sensible aux toxiques que les autres insectes reste controversée. Hardstone et Scott estiment que cette sensibilité n'est pas démontrée sur un plan général, mais considèrent que l'abeille est relativement plus sensible à certains types de contaminants, notamment les néonicotinoïdes (fig1 de cette étude). Cette étude a toutefois de grosses limites puisqu'elle ne considère que les DL_{50} topiques aiguës (les toxicités par voie orale et par exposition chronique ne sont donc pas considérées) (Hardstone & Scott 2010).

Pour situer la toxicité, on réfère à l'échelle d'Atkins (Atkins *et al*. 1981): sont considérées comme hautement toxiques pour l'abeille, les substances dont la DL_{50} est inférieure à 1,99 μg/abeille; comme moyennement toxiques, celles dont la DL_{50} varie de 2 à 10,99 μg/abeille; peu toxiques, celles dont la DL_{50} va de 11 à 100 μg/abeille et enfin, comme non toxiques, celles dont la DL_{50} est supérieure à 100 μg/abeille[14]. On notera toutefois que cette échelle reste cantonnée à la toxicité aiguë des molécules. Nous ne disposons pas actuellement d'une telle échelle, s'agissant des effets chroniques, létaux ou sublétaux.

2.2.5. Fidélité aux sources de butinage

L'abeille est fidèle à ses sources de butinage. Elle dispose d'une mémoire à court, moyen et long terme, qui lui permet de retrouver les fleurs qu'elle a butinées avec succès d'un voyage à l'autre et d'un jour à l'autre (nombreuses études, e.a. Giurfa 2003). De ce fait, si une culture mellifère est contaminée, l'abeille est exposée au contaminant en continu, car elle ne changera pas d'espèce florale tant que la culture contaminée produira du nectar. Une abeille peut ainsi être exposée tout au long de sa vie de butineuse, qui est d'une quinzaine de jours. De là vient l'importance de considérer la toxicité par exposition chronique dans l'évaluation des molécules potentiellement toxiques, et pas seulement les doses létales par exposition aiguë.

2.2.6. L'importance des effets sublétaux

Mais surtout, des effets toxiques sublétaux pour l'individu peuvent être mortels pour la colonie. Comme dit précédemment, la colonie est en effet auto-régulée et son niveau

[14] Le site de l'Université de Floride donne une liste des pesticides hautement et moyennement toxiques pour l'abeille : http://edis.ifas.ufl.edu/aa145

d'activité est régulé par des comportements modulateurs, avec pour effet que l'adéquation de la réponse de la colonie à ses propres besoins et aux circonstances dépend de la justesse des perceptions de l'abeille et des réponses comportementales qu'elle y apporte. Si les schémas perceptifs et comportementaux d'une proportion significative d'abeilles sont altérés, l'organisation de la colonie est perturbée, la perturbation pouvant aller jusqu'à la disparition de la colonie.

En particulier, les comportements assurant l'hygiène (enlèvement des larves mortes, bonne disposition du nid…) sont essentiels dans la prévention et la curation des maladies, l'immunité de l'abeille étant largement de type social (e.a. Wilson-Rich *et al.* 2009, Evans & Spivak 2009). La bonne orientation de la butineuse est également essentielle ; si des butineuses ne retrouvent pas le nid, des abeilles d'intérieur deviendront butineuses à leur tour par le jeu de la phéromone des butineuses (voir plus haut, le point relatif à la biologie). Ce mécanisme peut expliquer comment une ruche peut se vider de ses abeilles jusqu'à n'y abandonner que la reine, le couvain et les réserves ; une telle colonie est bien évidemment condamnée à la mort.

Les effets sublétaux des molécules insecticides sur l'abeille sont connus de longue date. Ils ont été mis en évidence, d'abord, pour le parathion, insecticide organophosphoré agissant sur l'acétylcholinestérase, et donc sur le système nerveux central puisque chez l'abeille, l'acétylcholine est l'un des neurotransmetteurs essentiels du cerveau. Notamment, le parathion a pour effet de fausser l'angle qu'indiquent les danseuses lorsqu'elles transmettent la direction d'une source de nectar (Stephen & Schricker 1970 *in* Cox & Wilson 1984). Depuis ces premières recherches, de très nombreuses études ont montré les effets sublétaux d'autres familles d'insecticides (pyréthrinoïdes, néonicotinoïdes et phénylpyrazoles notamment).

De nombreuses méthodes existent donc pour évaluer les effets sublétaux des contaminants sur l'abeille ; l'un des plus utilisés est le test d'extension de la langue (*proboscis extension reflex* = PER), qui utilise un réflexe pavlovien de l'abeille : lorsque celle-ci, dans le même temps qu'elle perçoit une odeur (florale dans la nature), reçoit du sucre (le nectar dans la nature), elle étendra la langue lors d'une présentation ultérieure de l'odeur, même si elle ne reçoit pas de sucre dans le même temps (Kuwabara 1957). Ce réflexe est essentiel à la performance de butinage : l'abeille apprend sur une fleur le lien couleur-symétrie-odeur-nectar, et n'a plus à renouveler ultérieurement un quelconque apprentissage : le butinage sur les fleurs suivantes se fait à l'aide d'automatismes qui rationalisent le butinage. Les expériences utilisant le PER sont variées et permettent de tester les facultés d'apprentissage (nombre d'essais avec sucre avant que l'abeille n'étende la langue par le seul contact de l'odeur) ou d'habituation (nombre d'essais sans sucre pour que l'abeille cesse de faire le lien odeur-sucre, donc ne tire plus la langue lorsqu'elle reçoit l'odeur seule). Elles permettent aussi de vérifier le niveau de discrimination des odeurs par l'abeille. Elles peuvent également être faites en utilisant un stimulus tactile plutôt qu'olfactif (Erber *et al.* 1998), car l'abeille est également sensible à la texture des pétales, qu'elle perçoit par les sensilles des antennes, et mémorise les informations tactiles.

2.2.7. L'importance de la durée de vie

Les abeilles ont une durée de vie limitée ; une fois devenues butineuses, leurs jours sont comptés. D'une part, butiner est une activité à risques ; d'autre part, l'abeille qui a volé plus d'un certain kilométrage finit par mourir faute de pouvoir encore voler. Le vol épuise en effet les réserves de glycogène qui se trouvent au niveau des muscles des ailes, et que l'abeille, au fil de sa vie, peine de plus en plus à renouveler. La fin de l'abeille-individu est donc programmée dès qu'elle entreprend le vol (Neukirch 1982). Toutefois, la durée de vie des butineuses a une influence importante sur le devenir de la colonie. Dans une étude récente (Khoury *et al.* 2011), des chercheurs ont élaboré un modèle mathématique montrant comment évolue la population d'une ruche en fonction du taux de disparition des

butineuses. De ce modèle, il apparaît que si le nombre des butineuses diminue au-delà d'un certain point, la colonie disparaît entièrement par collapsus : à un moment donné en effet, il n'y a plus assez de butineuses pour ramener à la ruche la quantité de ressources nécessaires à assurer le renouvellement des générations. Si des nourrices deviennent précocement butineuses pour tenter de compenser ce manque, il n'y a alors plus assez de nourrices pour assurer ce renouvellement. Dans les deux cas, la population de la colonie s'effondre. Dans le modèle, ce « point de basculement » est atteint lorsque le tiers des butineuse disparaît chaque jour ; mais les auteurs eux-mêmes relèvent que dans la réalité, une colonie s'effondrerait bien plus vite que cela car il se produit des phénomènes « en boule de neige » dès que la colonie décroit : carences de thermorégulation, apparition de maladies par défaut de soins au couvain, cannibalisme des larves lorsque la colonie se trouve en manque de protéines… Sans en arriver là, tout raccourcissement de la vie des abeilles a pour conséquence un moindre chevauchement des générations et par conséquent une moindre vitalité de la colonie. Les effets des contaminants sur la durée de vie sont établis ; notamment, le fait d'avoir été élevée dans un rayon dont la cire est fortement contaminée par des pesticides agricoles réduit de plusieurs jours l'espérance de vie de l'abeille (Wu *et al.* 2011).

2.2.8. Interactions contaminants / flore microbienne et parasites de la ruche

Les interactions entre parasites de l'abeille et contaminants ont fait l'objet de plusieurs études. Sans surprise, ces deux stresseurs se potentialisent mutuellement, ne serait-ce que parce que les réactions de défense de l'abeille à l'un comme à l'autre puisent dans ses réserves d'énergie. Ainsi par exemple, les synergies entre fipronil et imidaclopride d'une part, et le microsporidien parasite et pathogène opportuniste de l'abeille *Nosema sp.* d'autre part, ont-elles été démontrées (Alaux *et al.* 2010, Vidau *et al.* 2011, Aufauvre *et al.* 2012).

Mais d'autres interactions plus indirectes sont à relever. Un premier exemple concerne ce même *Nosema sp.* Celui-ci, qui est incapable de pourvoir aux nécessités de son propre métabolisme, puise dans les ressources énergétiques de son hôte. Ce faisant, il accroît la consommation en sucres de l'abeille et par conséquent l'exposition de celle-ci à toute substance qui contaminerait le nectar (Alaux *et al.* 2009). Autre exemple, la contamination des cires par les pesticides accroît la durée de développement de la larve (Wu *et al.* 2011), ce qui constitue un facteur favorable au développement de *Varroa destructor* dont le taux de reproduction est fonction de la durée de la période précédent l'émergence de l'insecte.

Cela dit, tout hôte de la ruche n'est pas forcément pathogène, loin s'en faut, et les effets des contaminants concernent également l'écologie microbienne de la ruche. Une étude récente de l'USDA de Tucson met en lumière l'importance de celle-ci dans l'équilibre sanitaire de la colonie. La flore microbienne de la ruche est largement co-évoluée avec l'abeille et compte d'importants groupes de symbiontes ; quant aux pathogènes, ils sont de façon générale opportunistes. Or certains facteurs, et notamment les contaminants, sont susceptibles d'altérer cette flore, avec pour conséquence possible des déséquilibre entre symbiontes et commensaux d'une part et pathogènes d'autre part ; on a d'ailleurs observé que cette fore est différente dans les colonies atteintes de CCD de ce qu'elle est dans les colonies saines. Aussi les contaminants pourraient-ils avoir des effets indirects sur l'abeille au travers de l'effet qu'ils ont sur la microflore qui lui est spécifique (Anderson *et al.* 2011). Les auteurs concluent en appelant à un usage raisonné des contaminants agricoles, vu leur impact sur les micro-organismes dont la nature et l'abondance des populations sont susceptibles d'influer largement sur la santé de l'abeille.

2.3. Modalités d'exposition de l'abeille aux contaminants

2.3.1. Types d'exposition

Orale, topique. L'exposition de l'abeille peut être orale ou topique (de contact). L'exposition est orale lorsque le toxique contamine une substance ingérée par l'abeille, c'est à dire le nectar, le pollen, le miellat, ou l'eau. L'exposition est topique lorsque l'abeille est contaminée par contact, au travers du tégument. Typiquement, la pulvérisation d'un produit phytosanitaire concernera surtout les butineuses, par exposition topique, tandis qu'un produit utilisé en traitement de semences entraînera une exposition orale de toutes les catégories d'abeilles. Cette vision simple mérite toutefois d'être affinée : des pesticides appliqués en pulvérisation peuvent être intégrés dans le pollen que les butineuses ramènent à la ruche et par voie de conséquence contaminer le pain d'abeilles, et toutes les catégories d'abeilles qui consomment celui-ci (Smodis-Skerl *et al.* 2009).

Aiguë, chronique. L'exposition peut être aiguë ou chronique. Les butineuses exposées à une dérive de pulvérisation sont typiquement exposées de façon aiguë. Cette première contamination peut être suivie d'une contamination chronique des abeilles d'intérieur si les butineuses ramènent à la ruche du pollen contaminé comme vu précédemment.

L'exposition chronique se fait soit en continu (en laboratoire ou dans la nature) soit par doses répétées (en laboratoire, une dose chaque matin suivie d'un nourrissement *ad libitum* au sirop non contaminé). L'exposition chronique est testée sur 10 ou 11 jours ; au-delà de ce délai apparaissent des problèmes de mortalité dans les contrôles, car l'abeille est privée de l'essentiel de sa vie sociale dans les cagettes de laboratoire utilisées dans ce type de test, ce qui diminue de beaucoup son espérance de vie.

On relèvera que pour beaucoup de substances, la toxicité varie fortement selon le mode d'administration, dose unique ou exposition en continu (Illarionov 1991) ou par doses répétée (DEFRA 2007)

2.3.2. Voies d'exposition

La contamination peut se faire par l'eau (gouttes de rosée contaminée par des retombées d'origine industrielle ou agricole, eau d'exsudation de plantes issues de graines traitées…), par l'air (dérive, poussières industrielles ou de semis de semences traitées…) et par les matrices apicoles (nectar et pollen). Elle peut être directe ou indirecte via la contamination de l'intérieur de la ruche. Outre les réserves de pollen ou de miel, les cires peuvent elles aussi être contaminées tant par les pesticides agricoles que par les pratiques apicoles (produits de traitement des maladies, de la varoose particulièrement), avec des incidences sur l'état sanitaire des larves (Wu *et al.* 2011, Wu *et al.* 2012)

Il n'est pas toujours aisé de discriminer le mode d'exposition lorsqu'une contamination a eu lieu. Si le toxique, par exemple, est présent dans des poussières fines en suspension dans l'air, l'exposition peut être aussi bien orale – via le pollen contaminé par les poussières de l'air, via l'eau de rosée collectée sur une culture ou sur des adventices… - que topique, via les poussières captées par le corps de l'abeille, dont les poils branchus retiennent facilement les particules de très petite taille (Tapparo *et al.* 2012). De même, une dérive, à l'occasion d'une pulvérisation de produit phytopharmaceutique, peut provoquer une intoxication par contact, mais aussi orale, via la contamination de l'eau, d'adventices butinées ou du pollen collecté par l'abeille.

Toute étude toxicologique d'un xénobiotique auquel l'abeille est susceptible d'être exposée doit donc

- examiner avec soin les voies d'exposition de l'abeille
- définir, sur base des concentrations attendues dans l'environnement et sur base des voies d'exposition, les quantités de contaminants auxquelles les différentes catégories d'abeilles sont susceptibles d'être exposées
- examiner avec soin, le cas échéant, la toxicité chronique létale et sublétale,

Bibliographie

Alix A, and Vergnet Chr, 2007: Risk assessment to honey bees: a scheme developed in France for non-sprayed systemic compounds, Pest Manag Sci.63: 1069-1080

Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C et al., 2009: Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*), Environmental Microbiology, doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x

Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM and DeGrandi-Hoffman G, 2011: An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honeybee and hive (*Apis mellifera*), Insect. Soc. 58: 431-444

APENET 2009: Effects of coated maize seed on honey bees, Report based on results obtained from the first year of activity of the APENET project, CRA-Api (Unita di riserca di apicoltura e bachicoltura, Bologna, Italy

Atkins EL, Kellum D and Atkins KW, 1981: Reducing pesticide hazards to honeybees: mortality prediction techniques and integrated management strategies, University of California, Div. Agric. Sci., Leaf 2883: 1-23

Aufauvre J, Biron DJ, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F and Blot N, 2012: Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee, Scientific Reports 2 326, Doi: 10.1038/srep00326

Badiou-Bénéteau A, Crvalho SM, Brunet JL, Carvalho GA, Buleté A, Giroud B and Belzunces LP, 2012: Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic.... Ecotoxicol. Environ. Saf. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.005

Balderrama NM, Almeida LO and Nuñez JA, 1992: Metabolic rate during foraging in the honeybee, J. Comp. Physiol. B 162: 440–447

Belzunces, LP, Tchamitchian S and Brunet JL, 2012: Neural effects of insecticides in the honey bee, review, Apidologie, INRA, DIB and Springer-Verlag, DOI: 10.1007/s13592-012-0134-0

Bischoff G, 2010: Chemische Bienenuntersuchung: Detail des neuen Verfahrens und ausgewälte Ergebnisse seit 2008, Julius-Kühn Archiv 428: 466

Bortolotti L, Sabatini AG, Mutinelli F et al., 2009: Spring honeybee losses in Italy, Hazards of Pesticides to Bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group Proceedings, Julius-Kühn-Archiv 423: 148-152

Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW *et al.*, 2010: Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. PLoS ONE 5: e13181. doi:13110.11371/journal.pone.0013181.

Camazine S, 1991: Self-organizing pattern formation on the combs of honey bee colonies, Behavioural Ecology and Sociobiology, 28(1) : 61-76

Chen Y and Evans JD, 2007: Historical Presence of Israeli Acute Paralysis Virus in the United States, Americanbee Journal, nov. 2007, American Bee J. 147:1027–1028.

Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008: *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States, Journal of Invertebrate Pathology 97 :186–188

Colin ME, 2008: L'opportunisme chez *Nosema ceranae*, Abeilles et fleurs n°690, janvier 2008, pp. 30-33

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC *et al.*, 2007: A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318, 283–287

Cox RL and Wilson WT, 1984: Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L (Hymenoptera : Apidae), Environ. Entomol. 13 : 375-378

Crailsheim K, 1990: the protein balance of the honey bee, Apidologie 21, 417–429.

Cresswell JE, 2010: A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees, Ecotoxicology, DOI 10.1007/s10646-010-0566-0, available online: http://www.farmlandbirds.net/sites/default/files/Creswell%20Bee%20Article%20(2).pdf

Decourtye, A., 2003: Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season, Pest Manag Sci 59: 269–278

Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., Pham-Delègue, M.H., 2005: Comparative sublethal toxicity of none pesticides on olfactory learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*, Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 48, 242 – 250

DEFRA 2007: DEFRA, 2007. Assessment of the risk posed to honeybees by systemic pesticides. Project PS2322. CSL, York, UK, 20 pp.

Dyer FC, 1987: Memory and sun compensation by honey bees, J Comp Physiol 160 : 621-633

EFSA, Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2012: Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (Apis mellifera, Bombus spp. and solitary bees), EFSA Journal 2012;10(5) 2668, 275 pp., doi:10.2903/j.efsa.2012.2668. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

Erber J, Kierzek S, Sander E and Grandy K, 1998: Tactile learning in the honeybee, J. Comp. Physiol. A 183: 737–744

Evans J and Spivak M, 2009: Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. J. Invertebr. Pathol., doi:10.1016/j.jip.2009.06.019

Fahrenholz L, Lamprecht I and Schricker B, 1989: Thermal investigation of a honeybee colony: thermoregulation of the hive during summer and winter and heat production of members of the different bee castes, J. comp. physiol. B 159 : 551 – 560

Forster R, 2009: Bee posoining caused by insecticidal treatment of maize in Germany in 2008, Julius-Kühn Archiv 423: 126-133

Frisch K von, 1964: La vie des abeilles (*Aus dem Leben der Bienen*), traduction française, Albin Michel, septième édition, 1969, 255pp.

Gilliam M, 1972: Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts, Amidologie 1979 10 (1): 43-53

Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C and Tapparo A, 2009: Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees, J. Econ. Entomol. 102 (5): 1808-1815

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Greatti M, Giorio C, Marton D and Tapparo A, 2011: Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication, J. Appl. Entomol., DOI: 10.1111/j.1439-0418.2011.01648

Giurfa M, Zhang S, Jenett A, Menzel R and Srinivasan MV, 2001: The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect, Nature 410(6831): 930-933

Giurfa M, 2003: The amazing mini-brain: lessons from a honey bee, Bee World 84(1): 5–18

Hardstone MC and Scott JG, 2010: Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? Wiley interscience, published online: www.interscience.wiley.com DOI 10.1002/ps.2001

Higes M, Martín R and Meana A, 2006: *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe, J.Invertebr. Pathol., 92 : 93-95

The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006 : Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera, Nature 443 : 931 – 949

Hyne RV et Maher WA, 2003: Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline, Ecotoxicol. Environ. Saf. 54 : 366–374

Illarionov AI, 1991: Toxic effects of some insecticides on the honeybee. Agrokhimiya 8:121–125

INRA, 2003: Impact de la contamination du miel par le fipronil sur l'activité et la survie des abeilles : aspects physiologiques et analytiques, rapport d'étude du programme communautaire sur l'apiculture, non publié

Invernizzi C, Abud C, Tomasco JH, Harriet J, Ramallo G, Campá J, Katz H, Gardiol G and Mendoza Y, 2009: Presence of Nosema ceranae in honeybees (*Apis mellifera*) in Urugay, Journal of invertebrate pathology 101 (2): 150-153

Johnson RM, When Z, Schuler MA and Berenbaum MR, 2006: Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases, J. Econ. Entomol. 99(4): 1046-1050

Khoury DS, Myerscough MR, and Barron AB, 2011: A Quantitative Model of Honey Bee Colony Population Dynamics, PLoS ONE 6(4): e18491. doi:10.1371/ journal.pone.0018491

Kleinhenz M, Bujok B, Fuchs S and Tautz J, 2003: Hot bees in empty broodnest cells: heating from within, The Journal of Experimental Biology 206, 4217-4231 doi:10.1242/jeb.00680

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G and Given K, 2012: Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields, PLoS One 7(1): e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268

Kühnholz S and Seeley TD, 1997: The control of water collection in honeybee colonies, Behav Ecol Sociobiol 41: 407-422

Kuwabara M, 1957: Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifica* (Mit 1 Textabbildung), 北海道大學理學部紀要, Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University Series VI. ZOOLOGY, 13(1-4): 458-464

Laurino D, Porporato M, Patetta A and Manino A, 2011: Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests, Bulletin of Insectology 64 (1): 107-113

Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G, Plettner E, Toth AL, Wang M, Huang Z, Jean-Marc Bécard JM, Crauser D, Slessor KN, and Robinson GE, 2004: Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees, PNAS 101 (50) : 17559–17564

Mattila HR, Harris L and Otis GW, 2001: Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, Insectes Soc. 48, 88–93.

Menzel R, De Marco RJ and Greggers U, 2006: Spatial memory, navigation and dance behaviour in *Apis mellifera*, review, J Comp Physiol A (2006) 192:889–903

Neukirch A., 1982: Dependence of the Life Span of the Honeybee (*Apis meilifica*) upon Flight Performance and Energy Consumption, J Comp Physiol 146:35-40

Nikolakis A, Chapple A, Friessleben R *et al.*, 2009: An effective risk management approach to prevent bee damage due to the emission of abraded seed treatment particles during sowing of seeds treated with bee toxic insecticides, Hazards of Pesticides to Bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group Proceedings, Julius-Kühn-Archiv 423: 132-148

Olofsson TC and Vásquez A, 2008: Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*, Curr Microbiol 57:356–363

Otis GW, Wheeler DE, Buck N and Mattila HR, 2004: Storage proteins in winter honeybees, Apiacta 38: 352-357

Owens Ch., 1971: The thermology of wintering honey bee colonies, Agricultural Reaserch Service, USDA.

Rader R, Howlett BG, Cunningham SA, Westcott DA, Newstrom-Lloyd LE, Walker MK, Teulon DAJ and Edwards W, 2009: Alternative Pollinator Taxa are Equally Efficient but not as Effective as the Honeybee in a Mass-flowering Crop, Journal of Applied Ecology 46: 1080-1087

Robinson JE and Ratnieks FLW, 1987: Induction of premature honeybees (Hymenoptera: Apidae) flights by juvenile hormone analogs administred orally or topically, J. Econ. Entomol. 80: 784-787

Schmid-Hempel P and Wolf T, 1988: Foraging effort and lifespan of workers in a social insect, Journal of Animal Ecology 57 : 500 – 521

Schmuck, R., Schöring, R., Stork, A., Schramel, O., 2001: Risk posed to Honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed-dessing of sunflowers, Pest management Sci, 57: 225-238

Schneider SS and Lewis LA, 2004: The vibration signal, modulatory communication and the organization of labor in honey bees, *Apis mellifera*. Apidologie **35** : 117 – 131 (review). Site internet d'Apidologie http://www.apidologie.org/

Seeley TD, Camazine S and Sneyd J, 1991: Collective decision-making in honey bees: how colonies choose among nectar sources, Behav Ecol Sociobiol 28: 277-290

Smodis-Skerl MI, Velikonja Bolta S, Basa Cesnik H and Gregorc A, 2009: Residues of pesticides in honeybee (Apis mellifera carnica) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83 (3): 374-377

Stabentheiner A., Pressl H., Papst T., Hrassnig N. and Crailsheim K., 2003: Endothermic heat production in honeybee winter clusters, The journal of experimental biology 206 : 353 – 358

Tapparo A, Marton D, Giorio C, Zanella A, Solda L, Marzaro M, Vivan L and Girolami V, 2012: Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds, Environ. Sci. Technol., DOI: 10.1021/es2035152

Theraulaz G, Bonabeau E and Deneubourg JL, 1998: Response threshold reinforcement and division of labour in insect societies, Proc. R. Soc. Lond. B 265: 327-332

Tokarz R, Firth C, Street C, Cox-Foster DL and Lipkin WI, 2011: Lack of Evidence for an Association between Iridovirus and Colony Collapse Disorder. PLoS ONE 6(6): e21844. doi:10.1371/journal.pone.0021844

Towne WF and Moscrip H, 2008: The connection between landscapes and the solar ephemeris in honeybees, The Journal of Experimental Biology 211, 3729-3736

UNEP, 2010: Global honeybees colony disorders and other threats to insect pollinators, Division of early warning assessment, United Nations Environment Programme, http://www.unep.org

Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B et al., 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

Watanabe ME, 2008: Colony collapse disorder: Many suspects, no smoking gun, Bioscience 58: 384–388

Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH and Starks PhT, 2009: Genetic, individual and group facilitation of disease résistance in insect societies, Ann. Rev. Entomol. 54: 405 - 423

Winston ML, 1987: La biologie de l'abeille, Nauwelaerts et Frison-Roche Ed., 1993 pour l'édition française

Wolf TJ, Schmid-Hempel P, Ellington CP and Stevenson RD, 1989: Physiological correlates of foraging efforts in Honey-Bees : oxygen consumption and nectar load, Functional Ecology 3 (4) : 417-424

Wu JY, Anelli C and Sheppard WS, 2011: Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity, PLoS ONE 6(2): e14720. doi:10.1371/journal.pone.0014720

Wu JY, Smart MD, Anelli CM and Sheppard WS, 2012: Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection, J. Invertebr. Pathol., doi:10.1016/j.jip.2012.01.005

Biocides : la législation et les autorisations

1. La législation européenne relative aux biocides.

Les substances et produits biocides ressortissent à de nombreux règlements et directives, notamment ceux relatifs aux substances dangereuses, et à leur classification, emballage et étiquetage (directive 88/379/CEE).

Une directive les concerne spécifiquement: celle relative à la mise sur le marché des produits biocides, que nous examinons avec plus de détails ci-dessous, parce que c'est d'elle que dépendent la manière dont les substances et produits biocides sont évalués, autorisés, et parce qu'elle fixe les précautions qui concernent leur étiquetage et leur utilisation.

1 .1. La directive relative à la mise sur le marché des produits biocides

La mise sur le marché des biocides est régie par la directive européenne 98/8/CEE et ses annexes. Cette directive prescrit que ce sont les Etats membres qui autorisent les produits biocides. Ces produits ne peuvent toutefois contenir que les substances actives listées à l'annexe I de la directive 98/8/CEE; l'insertion d'une substance dans cette liste relève de la compétence de la Commission européenne, qui est assistée par un Comité permanent pour les produits biocides (art. 28). L'annexe I liste de façon exhaustive les substances actives pouvant être utilisées dans les produits biocides ; l'annexe V liste de façon exhaustive les 23 types de produits biocides pouvant faire l'objet d'une autorisation.

Les substances sont donc autorisées au niveau européen, les produits au niveau des Etats membres tout comme il en va pour les produits phytopharmaceutiques.

Les autorisations, tant celles des produits que celles des substances, ne sont délivrées qu'au terme d'une évaluation fondée sur un dossier toxicologique et écotoxicologique. L'évaluation des substances se fait au travers de l'évaluation d'un produit au moins ; c'est pourquoi le processus d'autorisation d'une substance est initié au niveau d'un Etat membre, qui instruit le dossier puis le transmet à la Commission, ainsi qu'aux autres Etats membres pour consultation. Seuls les produits biocides à faible risque, qui sont listés à l'annexe 1A de la directive, sont dispensés d'autorisations ; un enregistrement est toutefois requis.

1.1.1. Critères d'autorisation

Le pivot central de l'évaluation des produits biocides est l'article 5 de la directive. Selon les parties de cet article pertinentes pour la toxicité sur l'abeille, *les Etats membres autorisent un produit biocide uniquement:*

a° (…)

b) s'il est établi, compte tenu de l'état des connaissances scientifiques et techniques, et s'il apparaît lors de l'examen du dossier prévu à l'article 8 en vertu des principes communs d'évaluation des dossiers tels qu'ils sont définis à l'annexe VI que, lorsqu'il est utilisé de la manière autorisée et eu égard:

— à toutes les conditions normales dans lesquelles le produit biocide peut être utilisé,

— à la manière dont le matériau qu'il sert à traiter peut être utilisé,

— aux conséquences que peuvent avoir son utilisation et son élimination,

le produit biocide(…) iv) n'a pas, intrinsèquement ou par l'intermédiaire de ses résidus, d'effet inacceptable sur l'environnement, compte tenu particulièrement des aspects suivants:

— son devenir et son comportement dans l'environnement, notamment en ce qui concerne la contamination des eaux de surface (y compris les eaux des estuaires et de mer), les eaux souterraines et les eaux potables,

— son effet sur les organismes non cibles.

En outre cet article ajoute une condition supplémentaire à l'autorisation d'un produit biocide : il faut que *la nature et la quantité de ses substances actives et, le cas échéant, les impuretés et autres composants significatifs du point de vue toxicologique ou écotoxicologique et de ses résidus significatifs du point de vue toxicologique ou environnemental, résultant d'utilisations autorisées,* [puissent] *être déterminées en vertu des exigences pertinentes énumérées aux annexes II A, II B, III A, III B, IV A ou IV B*; en d'autres termes, il faut que l'on dispose des méthodes d'analyse permettant de quantifier les résidus présents dans l'environnement afin de vérifier que le risque toxicologique n'est pas inacceptable en regard de la toxicité pour les organismes non-cibles définie par ailleurs.

L'évaluation des substances actives biocides se trouvant déjà sur le marché lors de l'entrée en vigueur de la directive, se fait au travers d'un programme de travail s'étalant sur 14 ans.

1.1.2. Autres dispositions

Les autorisations sont accordées pour une durée n'excédant pas dix ans. Elles peuvent être retirées lorsque les conditions énumérées à l'article 5 ne sont plus remplies (art.7 §1 b) ; elles peuvent également être modifiées, notamment par extension des utilisations, à condition toutefois que les exigences de l'article 5 restent remplies. Les détenteurs d'autorisations ont l'obligation de notifier à l'autorité compétente toute information nouvelle qui serait de nature à influer sur le maintien de l'autorisation (art. 14).

Des dérogations sont possibles, notamment pour répondre à un danger imprévu ou pour les autorisations provisoires (art. 15), dans le cadre de la recherche et du développement de produits nouveaux (art. 17) ou encore par le biais de mesures transitoires courant jusqu'au 14 mai 2014 (art. 16).

La directive prévoit un principe de substitution : *L'inscription d'une substance active à l'annexe I (…) peut être refusée ou retirée (…) s'il existe une autre substance active à l'annexe I pour le même type de produit qui (…) présente significativement moins de risques pour la santé ou pour l'environnement* (art. 10 §5).

Elle prévoit la confidentialité des données commercialement sensibles, sans préjudice toutefois de la législation relative à la liberté d'accès aux informations relatives à l'environnement. Notamment, la confidentialité ne s'applique jamais à certaines données, et parmi celles-ci *au résumé des résultats des essais requis par l'article 8 et destinés à établir l'efficacité de la substance ou du produit et ses incidences sur l'homme, les animaux et l'environnement, ainsi que, le cas échéant, son aptitude à favoriser la résistance*.

Les biocides doivent faire l'objet d'une « utilisation appropriée, englobant *la mise en œuvre rationnelle d'une combinaison de mesures physiques, biologiques, chimiques ou autres permettant de restreindre l'emploi des produits biocides au minimum nécessaire* (art. 3 §7)

La directive exige enfin des Etats membres qu'ils prennent des mesures de contrôle du respect des exigences qu'elle fixe.

1.2. Les annexes de la directive : contenu des dossiers

Le contenu des dossiers que le notifiant doit soumettre lorsqu'il sollicite une autorisation est défini aux annexes IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV A et IV B.

- l'annexe IIA liste les données communes à toutes les substances biocides ; tous les points listés par cette annexe doivent donc faire l'objet d'un point dans le dossier de demande d'autorisation pour une substance ;
- l'annexe IIB liste les données communes à tous les produits biocides ; tous les points listés par cette annexe doivent donc faire l'objet d'un point dans le dossier de demande d'autorisation pour un produit ;
- l'annexe IIIA liste les données supplémentaires pour les substances ; parmi les points listés par cette annexe, le notifiant doit choisir ceux qui sont pertinents pour la substance pour laquelle il souhaite l'autorisation ;
- l'annexe IIIB liste les données supplémentaires pour les produits ; parmi les points listés par cette annexe, le notifiant doit choisir ceux qui sont pertinents pour le produit pour laquelle il souhaite l'autorisation ;
- les annexes IVA et IVB listent les données requises pour l'évaluation des substances et produits, respectivement, lorsque la substance active est un micro-organisme.

L'abeille n'est pas mentionnée dans les données communes ; elle l'est en revanche dans les données supplémentaires, qui requièrent que, le cas échéant, soit fournis :

- pour les substances chimiques, *la toxicité aiguë pour les abeilles et les autres arthropodes utiles, par exemple prédateurs* (point 3.1 de l'annexe IIIA) ;
- pour les produits chimiques, les données de (3.2) *toxicité aiguë pour les abeilles* et *d'effets sur les arthropodes utiles autres que les abeilles* (points 3.2 et 3.3 de l'annexe IIIB) ;
- pour les biocides dont la substance active est un microorganisme, l'effet sur les abeilles (point 8.3 de l'annexe IVA et 10.3 de l'annexe IVB).

Les essais doivent être réalisés conformément « à l'annexe V de la directive 67/548/CEE ». Cette annexe a été supprimée par la directive 2006/121/CE qui renvoie au *règlement de la Commission concernant les méthodes d'essai, tel que spécifié à l'article 13, paragraphe 2, du règlement (CE) n°1907/2006*, dit « règlement REACH » ; ce règlement relatif aux méthodes d'essais a été adopté par la Commission en 2008 (règlement (CE) n°440/2008).

1.3. Le contenu des dossiers d'évaluation

Substances : annexes IIA et IIIA

Le contenu des dossiers d'évaluation des substances actives fait l'objet de l'annexe IIA.

Celle-ci comprend plusieurs items pertinents pour l'évaluation des risques pour les abeilles, à savoir:

- les caractéristiques physiques des substances susceptibles d'influer sur leur dispersion dans l'environnement, et donc sur l'exposition des abeilles: pression de vapeur (le produit est-il volatil?), le coefficient de partage octanol-eau (le produit est-il lixiviable, systémique?), la stabilité ;
- certains items des études écotoxicologiques (point VII): le devenir et comportement dans l'environnement, la biodégrabilité, l'hydrolyse et la photolyse;

A ce niveau aucune étude spécifique sur l'abeille n'est prescrite.

Toutefois, en vertu de l'annexe IIIA, *si les résultats des études écotoxicologiques et de l'utilisation ou des utilisations projetées de la substance active indiquent un risque pour l'environnement* (point VII 2), d'autres études écotoxicologiques doivent être fournies notamment, si cela est pertinent en regard de l'usage des produits contenant la substance, la *toxicité aiguë pour les abeilles et les autres arthropodes utiles, par exemple prédateurs* (point XIII 3.1 de l'annexe IIIA).

Produits : annexes IIB et IIIB

Le contenu des dossiers d'autorisation pour les produits fait l'objet de l'annexe IIB.

Les items pertinents de celle-ci pour l'évaluation de l'exposition des abeilles et de la toxicité pour l'abeille sont essentiellement les études écotoxicologiques prescrites au point VII de cette annexe, en particulier les points 7.1 et 7.2 :

> *7.1. Voies prévisibles d'introduction dans l'environnement sur la base de l'utilisation envisagée*
>
> *7.2. Informations sur l'écotoxicologie de la substance active présente dans le produit, lorsqu'il n'est pas possible de faire des extrapolations au départ des données concernant la substance active elle-même.*

Cette annexe est complétée par l'annexe IIIB qui recommande, le cas échéant des études de distribution et de dissipation dans l'air, le sol et l'eau (utiles pour évaluer l'exposition de l'abeille) ainsi que la *toxicité aiguë pour les abeilles* (point XIII 3.2).

2. La législation belge relative aux biocides.

La directive 98/8/CE a été transposée en droit belge par l'arrêté royal du 22 mai 2003 (MB du 11 juillet 2003). Cet arrêté transpose fidèlement la directive, *mutatis mutandis* – par exemple, la notion de mise sur le marché relève d'une définition différente, s'appliquant au territoire de l'Union ou au territoire d'un Etat membre ; cette définition diffère donc entre les deux législations.

Le Ministre compétent pour délivrer les autorisations est le Ministre fédéral ayant l'environnement dans ses attributions. Il est assisté, outre l'administration, par le Conseil supérieur d'hygiène publique.

Les différences entre les deux législations, européenne et belge, tant soit peu notables, du point de vue qui nous occupe, sont les suivantes :

- Le caractère acceptable ou non des effets que peut avoir un produit biocide sur la santé humaine animale et l'environnement, s'apprécie en regard du principe de précaution dans la législation belge, alors que ce principe n'est pas évoqué dans la législation européenne (art. 3 §1 2°, 4ème tiret de l'arrêté royal) ;
- La procédure d'autorisation est précisée (art. 6 de l'arrêté). Cette procédure prévoit que le dossier, adressé au Ministre et transmis au Conseil supérieur d'hygiène publique, est déclaré complet et recevable – ou non – par le Conseil supérieur d'hygiène publique dans un délai de 14 jours après réception. Le Ministre statue sur la demande dans les 6 mois de la notification de complétude du dossier. Le requérant qui se voit refuser une autorisation peut adresser recours aux mêmes autorités que celles à qui il s'est adressé en première instance. Il a dans ce cas le droit d'être auditionné (art. 7 de l'arrêté).
- De même, si une autorisation est modifiée, complétée, suspendue ou supprimée, son détenteur a un droit de recours (non suspensif de la décision ministérielle) auprès du Ministre (art. 13 de l'arrêté).

- La liste des biocides autorisés, qu'en vertu de l'article 18 §3 de la directive il est obligatoire de tenir à jour, prend en Belgique la forme d'un registre ou chaque biocide dispose d'un n° d'autorisation (art. 33 et 34 de l'arrêté) ; cette liste est publiée sur le site web du SPF.
- En matière de publicité, la législation belge précise que *les publications ou documents techniques destinés aux vendeurs et utilisateurs de produits visés par le présent arrêté sont assimilés à la publicité commerciale*. Ces informations doivent donc répondre à toutes les exigences fixées pour la publicité commerciale, notamment quant à l'utilisation de publications ou données scientifiques, qui ne peuvent être utilisées de manière à fausser l'appréciation du lecteur.

Certains biocides (ceux relevant de la classe A) ne peuvent être vendus que par des vendeurs agréés, les plus dangereux - ceux figurant à l'annexe XII de l'arrêté, produits pouvant dégager des gaz toxiques - ne peuvent être utilisés que par des utilisateurs agréés qui sont tenus d'effectuer eux-mêmes les traitements utilisant ces produits.

Fipronil

Le fipronil (MB 46030) est un insecticide/acaricide de la classe des phénylpyrazoles. Cette substance active a de multiples usages : elle est utilisé en traitement phytosanitaire, mais aussi vétérinaire (colliers antiparasitaires) et biocide (lutte contre les fourmis et les termites).

1. Mécanisme d'action et principales propriétés physico-chimiques

Le fipronil est neurotoxique et ses propriétés insecticides sont basées sur sa neurotoxicité. Dans la littérature l'effet toxique du fipronil est imputé à son action sur les canaux chlore régulés par l'acide gamma-acido-butyrique (GABA), mais aussi sur ceux du glutamate (Naharashi *et al.* 2007, El Hassani *et al.* 2009). De travaux récents non encore publiés, il apparaît que le fipronil agit également sur l'acétylcholine[15]. Par ces actions, le fipronil perturbe la transmission de l'influx nerveux, causant une excitation neuronale anormale, et par voie de conséquence une paralysie sévère entrainant la mort de l'insecte (plusieurs auteurs, notamment *in* Gunasekara 2007). Ce mode d'action est partagé par certains des produits de dégradation du fipronil, notamment le fipronil-sulfone (MB 46136, produit de la métabolisation) et le désulfinyl-fipronil (MB 46513, produit de la photolyse); ceux-ci participent donc à son action toxique (Hainzl & Casida 1996, Zhao *et al.* 2005).

Le GABA est un neurotransmetteur commun aux vertébrés et aux insectes. Le fipronil est toutefois bien plus actif sur les récepteurs GABA des insectes que sur ceux des mammifères, une spécificité due à la plus grande affinité de la molécule pour les récepteurs GABA des insectes que pour ceux des mammifères (et non aux mécanismes de détoxification, contrairement à ce qui se passe pour d'autres insecticides). L'affinité des récepteurs GABA de la blatte américaine (*Periplaneta americana*) est ainsi 59 fois plus importante que celle des récepteurs GABA du rat (Zhao *et al.* 2003). Toutefois, la sélectivité de certains métabolites et produits de dégradation (fipronil-sulfone, désulfinyl-fipronil) est moins forte que celle de la molécule-mère, ce qui contribue à réduire la sélectivité de la substance (Hainzl *et al.* 1998); en particulier, l'activité du désulfinyl-fipronil sur les récepteurs GABA des mammifères est dix fois plus forte que celle du fipronil lui-même (Hainzl & Casida 1996).

Indépendamment de sa neurotoxicité, le fipronil a un effet cytotoxique. Cette cytotoxicité a été montrée sur des hépatocytes (Das *et al.* 2006), des entérocytes (Vidau *et al.* 2009) et des neurones (Vidau *et al.* 2011) humains. Le fipronil aurait pour cibles les mitochondries (Vidau *et al.* 2009), où il altérerait la production d'ATP en particulier par découplage de la phosphorylation oxydative (Vidau *et al.* 2011), provoquant à terme la mort cellulaire par incapacité de la cellule à produire encore l'énergie dont elle a besoin. Ce type de toxicité est partagé par deux des métabolites du fipronil, le fipronil-sulfone et le fipronil-sulfide (MB 45950). Chez l'abeille, la toxicité du fipronil pour les cellules du ventricule a été démontrée chez la larve (da Silva Cruz *et al.* 2010). Les cellules du tractus digestif des larves traitées montrent des signes de stress oxydatif mais aussi une accélération du processus de mort cellulaire, ce qui *révèle des aspects intéressants de l'action de cet insecticide neurotoxique dans un organe qui n'est pas la cible directe de ce composé chimique* (*ibid.*).

Le fipronil est une molécule chirale. Les deux énantiomères sont présents en principe en quantité équivalente dans les produits commercialisés. La toxicité des deux énantiomètres n'est pas égale ; par exemple la toxicité de (+) sur la daphnie *Ceriodaphnia dubia* est deux fois plus importante que celle du produit commercialisé alors que celle de (-) est deux fois moins importante que celle du produit (TDC Environmental 2007).

[15] Giurfa M, non publié, communication orale à la journée « L'homme et l'abeille » de la société centrale d'apiculture, 22 janvier 2011

Le coefficient de partage octanol/eau du fipronil (Pow= 3,5 – 4) le désigne plutôt comme un lipophile ; il est bioaccumulable (Conclusion on the Peer Review[16] p.2), et passe des aliments animaux dans leur lait tout comme son métabolite principal, le fipronil-sulfone (Le Faouder *et al.* 2007). Il est en principe peu systémique et peu lixiviable. Néanmoins, le fipronil et certains de ses métabolites sont présents dans les plantes issues de semences traitées ou cultivées sur sol traité, et transportés par le ruissellement ou la percolation par les eaux souterraines ; ils contaminent ainsi les eaux de surface (USGS 2004), l'eau de mer et les organismes qui y vivent, par exemple sur la côté sud-ouest des USA (Wirth *et al.* 2004, Bedienta *et al.* 2005) mais aussi en Europe, notamment dans le bassin d'Arcachon où il a été quantifié dans les sédiments, dans l'eau de mer et surtout dans les huîtres (IFREMER 2007).

Enfin, le fipronil apparaît comme un contaminant ubiquiste : vu ses usages multiples, il est retrouvé largement dans des analyses de monitoring y compris à des endroits où l'origine ne peut être cernée, notamment dans la poussière prélevée dans les habitations ou dans leurs abords immédiats, y compris lorsqu'aucune source (produits destinés à la lutte contre fourmis/termites, antiparasitaire chiens/chats) n'est connue des habitants (Mahler *et al.* 2009), dans l'air ambiant (ORAMIP 2005), dans les pelotes de pollen issues de cultures traitées ou non traitées (Bonmatin *et al.* 2007) ou récoltées dans le cadre d'un monitoring général des ruchers (Chauzat 2006), dans des eaux estuariennes ou des eaux de surface (IFREMER 2007, TDC 2007, USGS 2004…) ainsi que dans des aliments pour animaux y compris lorsqu'ils sont issus de cultures réputées non traités par cette molécule (Le Faouder *et al.* 2007). Cette dernière étude insiste sur la large contamination environnementale par le fipronil et ses produits de dégradation ; ceux-ci ont été retrouvés dans de nombreux échantillons de maïs, soya, blé et paille non traités, à tel point que les auteurs se sont assurés que la contamination n'était pas liée aux processus d'analyse en utilisant des blancs (eau, éthyl-acétate) dans chaque série d'analyses.

2. Principaux métabolites.

Le fipronil MB 46030 donne lieu à plusieurs produits de dégradation ou métabolites; quatre d'entre eux sont des premiers métabolites, issus des principales réactions de dégradation du fipronil:

- par réduction de la molécule-mère, le fipronil-sulfide MB 45950
- par oxydation de la molécule-mère, le fipronil-sulfone MB 46136
- par photolyse, le fipronil-désulfinyl MB 46513
- par hydrolyse, le fipronil-amide RPA 200766

(source : DAR vol 3, annexe B8 p. 459).

On rappellera que la sélectivité des produits de dégradation du fipronil est moindre que celle de la molécule-mère ; la sélectivité va décroissant comme suit : fipronil > désulfinyl-fipronil > sulfone (Hainzl *et al.* 1998).

3. Devenir et comportement

3.1. Dans les sols

Le « draft assessment report » (DAR dans la suite de ce texte) fait globalement les constats suivants :

[16] Il s'agit du document de synthèse rédigé par la Commission européenne ou par l'EFSA en conclusion de l'évaluation scientifique des molécules phytopharmaceutiques. Ces documents, comme les dossiers d'évaluation de ces molécules (les DAR : Draft Assessment Report) comportent des indications nombreuses quant aux risques des molécules pour l'environnement, et pour la santé humaine et animale.

- la voie principale de dégradation du fipronil est la photolyse ; la dégradation est plus lente dès que la molécule est à l'abri de la lumière
- la vitesse de dégradation du fipronil est inversement proportionnelle la température
- les données en matière de persistances sont extrêmement dispersées ; les chiffres varient de quelques jours à quasiment un an pour le seul fipronil.

Cette grande dispersion des chiffres se retrouve dans les autres sources.

Footprint considère une DT_{50} de 142 jours en laboratoire et de 65 jours au champ. Connelly considère une DT_{50} de 630 – 693 jours en conditions aérobies et de 123 jours en conditions anaérobies ; la demi-vie pour la dissipation en champ est de 102 à 160 jours (Connelly 2001). Gunasekara & Truong notent que la dégradation de la molécule-mère et de ses premiers métabolites varie de 111 à 350 jours (Gunasekara & Truong. 2007); Gunasekara *et al.* considèrent une demi-vie dans le sol de 188 jours en conditions aérobies et 19,3 à 22,2 jours en conditions anaérobies (Gunasekara *et al.* 2007). Dans une étude se rapportant à des sols australiens (Ying & Kookana 2006), la molécule-mère est encore présente et détectée dans les sols trois ans après l'application (cf. fig.1 de cette étude).

La vitesse de dégradation varie notamment avec les conditions du milieu. L'hydrolyse est ainsi 300 fois plus rapide à pH 12 qu'à pH 9 ; la formation de désulfinlyl-fipronil est accélérée en milieu oxydant (Gunasekara *et al.* 2007).

La persistance est vraisemblablement liée aussi au type de formulation et d'application. Un texte commercial comparant le produit termiticide Termidor SC® à base de fipronil à Premise®, produit similaire à base d'imidaclopride, estime que si le second peut persister 5 à 7 ans, Termidor quant à lui a l'avantage de persister généralement 8 à 10 ans (voir par exemple http://www.termite.com/termidor.html).

3.2. Dans les eaux

3.2.1. En rivière

Deux rapports (Demchek & Skrobialowski 2003 et USGS 2004) analysent la présence de fipronil et de ses produits de dégradation dans le bassin de la rivière Mermentau en Louisiane. Cette présence est consécutive aux cultures de riz largement répandues dans ce bassin ; le riz est cultivé à partir de semences enrobées au fipronil, enrobage autorisé à partir de 1996 et largement utilisé à partir de 1999 pour contrôler le charançon d'eau (*water weevil*). Dès l'été 1999, le fipronil a été soupçonné de causer des dégâts dans les populations d'écrevisses élevées à des fins commerciales dans le même bassin ; c'est dans ce contexte que des études ont été demandées au service géologique. Ces études montrent la présence du fipronil et des trois produits de dégradation étudiés (fipronil-sulfone, fipronil-sulfide et désufinyl-fipronil) dans quasiment tous les échantillons prélevés dans les eaux de la rivière et de ses affluents. De tous les produits de dégradation, celui se trouvant dans les concentrations les plus élevées est le désulfinyl-fipronil (jusqu'à 1,13 μg/L) ; puis, dans l'ordre, le fipronil-sulfide (0,214 μg/L) et le fipronil-sulfone (0,202 μg/L). Les concentrations en produits de dégradation, de façon général, sont croissantes vers l'aval du bassin.

Un rapport sur l'état des eaux de surface en milieu urbain en Californie (TDC Environmental 2007) a été réalisé en suite d'incidents liés à la toxicité aquatique de la substance. Il s'agit d'une revue de données existantes (notamment la publication ci-dessus). Les conclusions des auteurs du rapport sont :

- que le fipronil a un effet néfaste sur les écosystèmes aquatiques
- que le devenir dans l'environnement du fipronil et de ses métabolites, et leur toxicité aquatique, ne sont pas complètement caractérisés à ce jour.

Les auteurs concluent en demandant que de nouvelles données soient établies notamment en mesurant la toxicité cumulative du fipronil et de ses différents produits de dégradation.

3.2.2. En milieux estuariens

Walse *et al*. ont étudié la dégradation du fipronil et la répartition de ses métabolites entre eau et sédiments au fil des heures. Le désulfinyl-fipronil se forme dans l'eau par photolyse mais s'accumule ensuite dans les sédiments ; le fipronil-sulfone se forme facilement dans l'eau mais n'existe qu'à l'état de traces dans les sédiments où se développe en revanche le fipronil-sulfide. L'étude conclut à la nécessité de mieux connaître l'exposition des organismes estuariens non-cibles au désulfinyl-fipronil, aussi bien par l'eau que par les sédiments (Walse *et al*. 2004).

Wirth *et al*. rapportent, sur la côte SE des USA, des concentrations en fipronil en aval de rizières traitées allant jusqu'à 8 mg/litre. La même étude a étudié l'effet du fipronil à trois concentrations (150, 355 et 5000 ng/litre) sur des organismes aquatiques (poissons juvéniles, huîtres adultes, palourdes (*clams*) et crevettes (*schrimp*)). Des effets létaux sont notés sur les crevettes pour les deux concentrations les plus élevées. L'étude conclut à la nécessité d'affiner les études d'exposition, vu le danger pour les crevettes des usages amenant le fipronil dans l'eau de mer, et sur la nécessité d'étudier les impacts à long terme d'expositions chroniques et sublétales, notamment sur la reproduction des poissons (Wirth *et al*. 2004).

Le rapport IFREMER 2007 rapporte la présence occasionnelle de fipronil et de ses métabolites sulfone et désulfinyl dans les eaux et les sédiments du bassin d'Arcachon (voir notamment la p. 17); mais surtout, le fipronil, le désulfinyl-fipronil et le fipronil-sulfone sont significativement présents dans les échantillons d'huîtres (Station de Comprian : fipronil dans 4% de échantillons, désulfinyl dans 17% des échantillons, sulfone dans 4% des échantillons ; station des Jacquets : fipronil dans 16% des échantillons, désulfinyl et sulfone dans 8% des échantillons – les teneurs en poids sec maximum sont de 0,15 μg/kg pour le fipronil, 0,62 μg/kg pour le désulfinyl et de 0,77 μg/kg pour le sulfone. Nous n'avons pas trouvé d'études fournissant de chiffres de toxicité pour le genre *Ostrea*, ni pour le fipronil ni à fortiori pour aucun de ses métabolites.

3.3. Dans l'air

La présence de fipronil dans l'air, lorsqu'elle a été analysée, à été rapportée principalement (mais pas toujours, cf. les rapports de l'ORAMIP ci-dessous) aux effets liés à l'usage du fipronil en tant que produit phytosanitaire, et plus précisément aux poussières de semis. Comme on l'a vu (point 1 .2.1. de l'introduction), les semences traitées, lorsqu'elles sont mises en terre par un semoir pneumatique, y sont soumises à une abrasion qui dégage des poussières largement contaminées par l'insecticide, et poussières qui sont donc contaminantes pour le milieu extérieur. La question des poussières de semis, on l'a vu (introduction du rapport) est à l'origine de la directive 2010/21/UE qui modifie les directives d'inclusion des quatre substances insecticides utilisées comme pesticides agricoles en traitement de semences ; cette directive impose, notamment, que le traitement des semences soit fait dans des installations professionnelles, et que les semoirs pneumatiques soient équipés de déflecteurs lors du semis de graines traitées. La question de savoir si de telles mesures réduisent effectivement le risque pour l'entomofaune reste controversée à l'heure actuelle.

3.3.1. Les rapports de l'ORAMIP (Observatoire régional de l'air en Midi-Pyrénées)

Un rapport réalisé en 2004 en bordure de champs (ORAMIP 2004), avec semences traitées ou non, a montré la présence de fipronil dans l'air en bordure des parcelles traitées, mais aussi en bordure des parcelles non traitées. La concentration dans l'air allait de 6,3 ng/m^3 à 79,8 ng/m^3. Le rapport note : *il ressort de ces analyses que le fipronil est bien (…)*

détecté dans l'air ambiant durant la réalisation d'un semis malgré le procédé d'enrobage et la technique d'enfouissement.

Un rapport réalisé sur la période de mai à septembre 2005 (ORAMIP 2005) a analysé une série de pesticides présents dans l'air de 6 communes situées autour de Montauban, dans une région où l'arboriculture fruitière est très présente. Elle montre la présence de fipronil dans l'air pour 4 des 6 stations en milieu rural ayant fait l'objet de prélèvements:

- Castelsarrasin : 5,5 ng/m^3
- Lizac : 0,4 ng/m^3
- Villedieu-le-Temple : 2,7 ng/m^3
- Albefeuille-Lagarde : 5,8 ng/m^3

L'étude note (p.14) : *… la présence du fipronil a été mise en évidence au cours de quatre prélèvements en situation de fond rural. Cette présence dans l'air, aux niveaux de concentrations observés, reste à l'heure actuelle sans explication car ce composé dispose désormais d'une homologation très restreinte en terme de possibilité d'utilisation* [l'utilisation du fipronil en substance phytosanitaire a été interdite en France par un arrêté du 27 février 2004, NDLR]. *Les services de la DRAF se sont saisis de cette problématique et des recherches sur le secteur ont été menées pour expliquer la présence de ce composé sur ce secteur. Des mesures complémentaires seront réalisées au 1er semestre 2007 afin d'identifier l'origine des résidus de ce composé dans les échantillons.*

D'une recherche effectuée sur le site web de l'ORAMIP il apparaît qu'aucune étude ultérieure n'a été publiée et que ce point n'a donc pas été éclairci.

3.3.2. Le rapport de la DRAF – SRPV

Le service régional de la protection des végétaux (SRPV) de la Direction générale de l'agriculture et de forêts (DRAF) de Midi-Pyrénées (France) a réalisé une expérimentation visant à déterminer les effets des poussières de semis sur les abeilles (DRAF-SRPV 2003).

Ce rapport a été sollicité dans le cadre d'intoxications d'abeilles ayant eu lieu en Midi-Pyrénées au cours des années 2002 et 2003 (ces intoxications ont donné lieu à des actions en justice devant le tribunal de grande instance de St Gaudens).

Ce rapport conclut à l'existence de telles poussières et à leur toxicité pour les abeilles : *Des différences nettes peuvent être notées entre les modalités « Témoin » et les modalités « Traité ». Les mortalités cumulées étant en moyenne près de trois fois plus élevées dans ces dernières. Une augmentation des mortalités consécutive au semis est notée pour les modalités exposées, alors que, dans les modalités « témoin », elle reste globalement stable.*

Le rapport conclut à une contamination environnementale par les poussières issues du semis, avec pour conséquence des mortalités d'abeilles.

Les incidents « poussières »

Les incidents liés aux poussières de semis ont mené à la suspension des insecticides en traitement de semences (néonicotinoïdes et fipronil) dans plusieurs pays, comme on l'a vu précédemment (point 1 .2.1. de l'introduction).

Si en Italie, seuls les néonicotinoïdes ont été retrouvés (Bortolotti *et al.* 2009), en Allemagne les analyses ont aussi montré la présence de fipronil (Bischoff 2010). Le problème, toujours pendant, qui concerne les particules arrachées par l'abrasion aux enrobages des semences dans les semoirs pneumatiques concerne donc également cette molécule, même si elle a été moins étudiée, notamment parce qu'elle était absente des analyses en Italie et que les études indépendantes (Girolami *et al.* 2011, Tapparo *et al.* 2012) portant sur ce sujet ont été réalisées dans ce pays.

L'étude Mahler (Mahler *et al*. 2009)

Cette étude américaine a analysé, pour détection du fipronil et de deux de ses métabolites (désulfinyl-fipronil et fipronil-sulfide), des échantillons de poussières provenant de l'intérieur et de l'extérieur de 24 habitations situées à Austin, Texas (étude portant essentiellement sur des usages biocides). Au moins un des composés est détecté dans chacun des échantillons analysés ; les concentrations dans les poussières intérieures sont significativement plus importantes que dans celles provenant de l'extérieur des habitations, et cela même dans des habitations où aucun usage interne (collier antiparasitaire pour chiens ou chats, anti-termites) n'est connu. Le fipronil apparaît donc comme un composé ubiquiste, et l'étude conclut sur la nécessité d'investiguer les effets potentiels de l'exposition des êtres humains par cette voie.

Quoique son coefficient de partage octanol-eau fasse classer le fipronil dans les substances à caractère lipophile, et donc peu lixiviables par les eaux de pluie, la molécule et certains de ses produits de dégradation sont largement représentés dans les milieux aquatiques.

Ils sont également présents dans l'air pratiquement à chaque fois qu'ils sont recherchés.

Les poussières de semis apparaissent comme une voie de contamination majeure de l'environnement par le fipronil. Ce sont vraisemblablement ces poussières qui expliquent la présence large du photométabolite (désulfynil-fipronil) dans l'environnement malgré que les produits à base de fipronil, tant biocides que phytosanitaires, sont dévolus à des usages censés préserver la molécule du contact avec la lumière. Toutefois, les usages biocides ou vétérinaires peuvent également être à l'origine de contaminations, importantes dès que des anti-fourmis ou des anti-termites sont utilisés massivement. La contamination de l'intérieur des habitations mérite d'être surveillée.

4. Systémicité

La systémicité du fipronil a fait l'objet de controverses. La molécule est en effet plutôt lipophile, avec un log Pow de 3,5 à 4 (EFSA 2006, p. 57) ; toutefois la littérature montre qu'elle est susceptible de passer, d'un traitement de sol ou de semences, à l'ensemble de la plante y compris dans les matrices butinées.

(Le Faouder *et al*. 2007) montre la présence de fipronil et de métabolites (principalement le fipronil-sulfone) dans le fourrage utilisé pour l'alimentation de vaches laitières, ainsi que dans le lait des vaches nourries avec ce fourrage. L'étude conclut que la systémicité du fipronil est démontrée.

Bonmatin *et al*. ont analysé 107 échantillons de pollen de maïs et tournesol analysés avec une LOD de 0,07 ng et une LOQ de 0,2 ng.

- 41 échantillons proviennent d'une culture non traitée dont 17% sont positifs (>LOD et <LOQ)
- 66 échantillons proviennent d'une culture traitée dont 48% sont positifs : 30% > LOD et 20%> LOQ.

Les métabolites ont été analysés dans les pollens contaminés issus de cultures traitées. Parmi ces échantillons :

- 95% contenaient du fipronil
- 53% contenaient du fipronil-sulfone
- 24% contenaient du fipronil-sulfide,
- 17% contenaient du désulfinyl-fipronil.

Le fipronil représente au total 77% de l'ensemble des fiproles, le fipronil-sulfone 17%, le fipronil-sulfide 5% et le désulfinyl-fipronil 1% (Bonmatin *et al*. 2007).

L'étude (Aajoud *et al*. 2008) est fondée sur l'examen de la distribution, dans les différentes parties de plants de tournesol, de fipronil marqué au C14 (467 µg/semence dont 30 µg radiomarqués ; l'enrobage Régent TS comporte environ 450 µg/semence[17]). Dans cette étude, la quantité de fipronil et de métabolites radiomarqués retrouvés dans l'inflorescence représente 0,6 ‰ de la quantité de substance active déposée sur la graine (soit 270 ng). Cette quantité est trop élevée pour provenir d'un transport à partir des feuilles ou pour avoir été amenée par le xylème. Les auteurs, par manipulation, montrent que le transport se fait via le phloème, et font l'hypothèse que les substances retrouvées proviennent des réserves accumulées dans les racines, réserves que la plante remobilise lorsqu'elle construit son inflorescence. Cette étude montre en outre que tous les principaux métabolites du fipronil se retrouvent dans l'inflorescence (fipronil-désulfynil, fipronil-sulfide, fipronil-amide et fipronil-sulfone) (cf. notamment la fig. 4 de la publication).

Il se déduit de cette étude que le fipronil est bien une substance systémique, qui est transportée via les sèves de la plante dans la feuille, les tiges, les racines, ainsi que dans l'inflorescence du tournesol. La publication conclut que *les conséquences* [du transfert de la molécule et de ses métabolites] *sur la physiologie de l'abeille requièrent des études spécifiques*.

Chauzat *et al*. ont analysé 81 échantillons de pollen prélevés dans 25 ruchers (5 ruchers dans 5 régions de France) ; pour chaque ruchers, 2 échantillons de pollen de trappe ont été prélevés sur 2 ruches (Chauzat *et al*. 2006). L'étude montre la présence de résidus de fipronil et de ses métabolites, comme suit :

- fipronil : teneurs supérieures à la limite de détection (0,3 ppb) et inférieures à la limite de quantification (0,5 à 2 ppb suivant le moment de l'étude) dans 10 échantillons sur 81 ;
- fipronil-désylfynil : teneurs allant de la LOD à 1,5 ppb dans 9 échantillons sur 81, teneur moyenne : 1,3 ppb,
- fipronil-sulfone : teneurs allant de 1,7 à 3,6 ppb dans 3 échantillons sur 81, teneur moyenne : 1,2 ppb ;

Le fipronil et le fipronil-désulfynil sont respectivement les 3ème et 4ème molécules en ordre de fréquence dans cet échantillonnage, derrière l'imidaclopride et son dérivé, l'acide 6-chloronicotinique.

Enfin, le fipronil est considéré comme responsable de pertes importantes de colonies d'abeilles en République Tchèque avant 2006, année où son usage sur colza (lutte contre le petit coléoptère parasitant les fleurs) a été interdit (Modra & Svobodova 2009).

De ces études il apparaît que, malgré que son coefficient de partage octanol-eau fasse classer le fipronil dans les substances à caractère lipophile, la molécule est systémique et donc susceptible de contaminer les plantes par pénétration à partir du sol ou de l'enrobage de graine, contaminant ainsi les matrices butinées par l'abeille.

[17] voir par exemple http://www.ineris.fr/pesticides/public_docs/manifestations/reims/J2_jeudi_08/1_evaluation_effets_chroniq_pestic_system_biol_integres_apr02/3_ravanel_pestic_reims_nov07_pr_web.pdf

5. Toxicité pour les abeilles

5.1. Introduction et toxicologie générale

Le meilleur résumé de la toxicologie du fipronil concernant l'abeille est donné par un rapport de l'INRA, relevant du programme communautaire sur l'apiculture pour l'année 2002 (INRA 2003).

Selon ce rapport : *Cet insecticide agit sur le système nerveux en inhibant le récepteur GABA, récepteur GABA exerçant une action inhibitrice sur l'activité neuronale. Il induit ainsi une hyper-excitation neurale qui conduit à la mort de l'insecte. (…) Chez l'insecte, les effets du fipronil sont donc susceptibles de se manifester de différentes façons et sur des systèmes physiologiques particulièrement importants. Toutefois, le mode d'action du fipronil et les résultats que nous avons obtenus montrent que son action pourrait se manifester d'une manière très ciblée :*

- *Nous avons observé que les abeilles peuvent rapporter à la ruche du nectar contenant des concentrations mortelles de fipronil. Ainsi, il est possible de constater une faible intoxication des butineuses, avec, en revanche, un fort taux d'intoxication des individus au niveau de la ruche. Ce phénomène induit donc une toxicité retardée par contamination du miel. Ce type d'intoxication est particulièrement prononcé lors du redémarrage printanier de la colonie.* Il est noté plus loin à ce propos : *cette absence d'effet chez les butineuses en activité pourrait s'expliquer par une plus faible absorption du toxique au niveau du jabot qu'au niveau de l'intestin.*
- *Chez l'insecte, le GABA agit comme neuromédiateur inhibiteur dans la régulation de l'activité des muscles de vol (Bai et Satelle 1995 ; Dudel et al. 1997). Ainsi, le blocage du récepteur GABA induit une suractivation des muscles de vol conduisant d'une part à leur incoordination et à une incapacité de voler pour l'insecte, d'autre part à un défaut de thermorégulation dépendante des muscles de vol. Les effets d'un défaut de thermorégulation sont très importants à basses températures et particulièrement lors du redémarrage printanier de la colonie. Il est inutile de noter qu'une mauvaise thermorégulation même passagère peut entrainer une incapacité de vol temporaire qui, si elle est d'une durée supérieure à deux heures, empêche l'abeille de rentrer définitivement à la colonie par épuisement de ses réserves énergétiques (Vandame et Belzunes 1998).* Une note explicative en bas de page : *la thermorégulation est nécessaire pour que les abeilles puissent voler à des températures supérieure ou égales à 11°C. Elle est due à la contraction tétanique des muscles de vol. Elle nécessite donc à la fois la parfaite intégrité des muscles de vol et leur parfaite coordination.*

5.2. Toxicité létale par intoxication aiguë

La DL_{50} (48h) du fipronil par voie orale est de 4,17 ng/abeille ; sa DL_{50} (48h) par contact est de 5, 93 ng/abeille (source : CPR p. 98). Ces chiffres classent le fipronil parmi les molécules les plus toxiques qui soient pour l'abeille. La NOEL est bien plus basse :

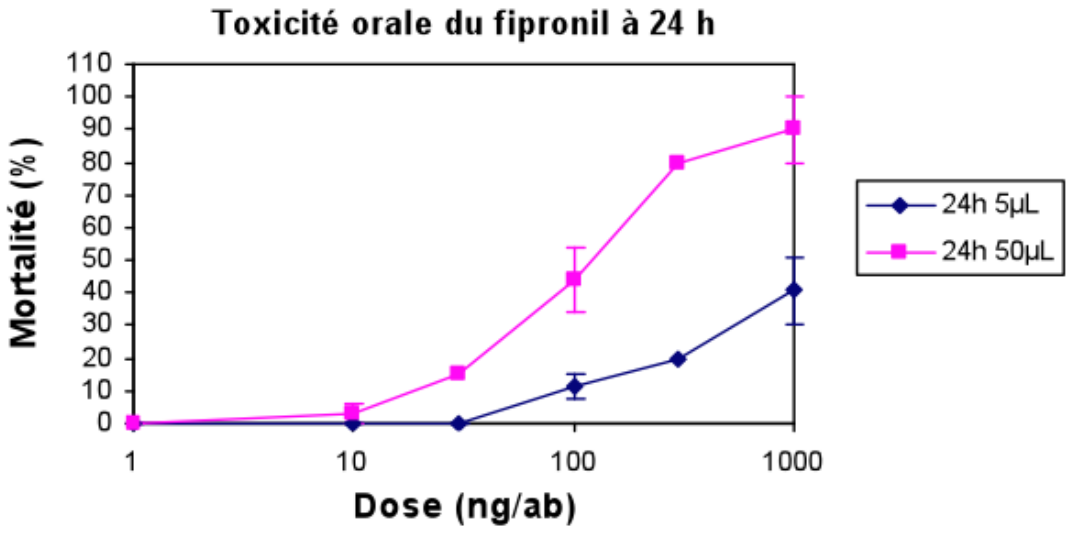
- une étude ACTA de retour à la ruche sous tunnel avec marquage RFID, note une mortalité 24 heures après l'ingestion de 1,5 ng/abeille en dose unique (20µl) (ACTA 2006 p. 17).
- El Hassani *et al.* notent une mortalité significative par rapport au groupe de contrôle dans tous les groupes d'abeilles traitées au fipronil 48 heures après le traitement, qu'il soit oral ou topique, et ce quelle que soit la dose : 0,1, 0,5 ou 1 ng/abeille (El Hassani *et al.* 2005).

5.2.1. Evolution de la mortalité au-delà de 48 heures

Le rapport CST 2005 note des DL_{50} aiguës s'échelonnant entre 4,17 et 10 ng/abeilles. La DL_{50} orale est plus basse à 72 heures qu'à 48 ou 24 heures, ce qui suggère, selon les auteurs, que des effets importants peuvent encore se manifester plusieurs jours après l'exposition au toxique (p. 41). A ce propos, (INRA 2003) note : *une autre caractéristique de l'action du fipronil chez l'abeille est l'évolution de la mortalité au-delà de 72 heures. Cela montre que des effets importants peuvent ne se manifester que plusieurs jours après l'exposition au toxique*. En pratique, la mortalité après ingestion d'une dose unique évolue sur plus de 100 heures (Luc Belzunces, communication orale). L'apparition d'une mortalité différée de plusieurs jours par rapport à l'exposition est également rapportée chez d'autres espèces (la sauterelle africaine *Ornithacris cavroisi* : Balança & de Visscher 1997, voir la fig. 5 de cette étude).

5.2.2. Courbes de mortalité en fonction du volume

L. Belzunces (non publié) note une différence importante entre les DL_{50} suivant le volume dans lequel les doses ont été administrées. Une même étude de toxicité orale à 24 heures montre une DL_{50} de 110 ng/abeille lorsque la dose est diluée dans 50 µL de sirop, et de 2000 ng/abeille lorsque la dose est diluée dans 5 µL de sirop.



Source du graphique: Belzunces 2011 (non publié, exposé au cours de perfectionnement du CARI, 26 février 2011)

5.3. Toxicité létale par intoxication chronique

5.3.1. Etudes concernant le fipronil

Aliouane *et al.* ont obtenu 100% de mortalité à 7 jours à la dose de 0,1 ng/jour tant par exposition topique réitérée (contaminant dans 1 µL déposé sur le thorax) que par exposition orale en continu (Aliouane *et al.* 2009).

Decourtye *et al.* notent plus de 90% de mortalité chez les abeilles nourries pendant 11 jours en continu au sirop contaminé à 9 µg/litre (ingestion moyenne : 33µL par abeille et par jour (soit une dose journalière de 0,297 ng) et 87% de mortalité à la moitié de cette dose (4,5 µg/litre soit 0,15 ng par abeille et par jour). A 2,2 µg/L, ce qui correspond à

0,07 ng/abeille (DL_{50}/70), dose qui est aussi la NOEC pour le PER (voir ci-dessous), la mortalité est encore de 40% (Decourtye *et al*. 2005).

Ces deux études sont concordantes et montrent que la DL_{50} par contamination continue est 40 à 60 fois inférieure à la DL_{50} aiguë.

Le rapport de l'INRA déjà mentionné note toutefois la grande variabilité des résultats obtenus par exposition subchronique de l'abeille (exposition en continu pendant 10 jours), ainsi que la stagnation des chiffres de mortalité au-delà de 7 jours. Ces constats s'expliqueraient selon les auteurs par le fait que toutes les catégories d'abeilles ne sont pas également sensibles au contaminant (INRA 2003, point 2.2 p. 5).

Le Comité scientifique et technique français a validé une seule étude de laboratoire (INRA d'Avignon) concluant à une NOEC (pas de mortalité observée) de 0,01 µg/l soit ≤ 8pg/abeille et, tenant en compte un coefficient de sécurité de 100, estime la PNEC (Predicted No Effects Concentration) à 0,08pg/abeilles (CST 2005).

5.3.2. Etude concernant les métabolites et produits de dégradation

Le désulfinyl-fipronil et le fipronil-sulfone ont une toxicité chronique supérieure à celle du fipronil avec une mortalité de quasiment 50% aux concentrations de 0,1 et 1 µg/L après 10 jours d'expérience (INRA 2003 *in* CST 2005 p. 45). Ce même rapport note que la concentration de 0,01 µg/litre (environ 0,0076 ppb sur base d'une densité de 1,3 pour le sirop 1/1) induit encore une mortalité de 30% pour le désulfinyl et 50% pour le sulfone ; la mortalité n'apparaît que le 4ème ou 5ème jour après l'exposition. La NOEC est donc inférieure à cette dose. Pour ces deux métabolites également les chiffres de mortalité n'évoluent plus après le 8ème jour d'exposition, ce qui laisse à penser qu'il y a des catégories d'abeilles plus sensibles que d'autres au contaminant.

Le fipronil-amide et le fipronil-sulfide sont plus toxiques encore, avec des taux de mortalité à 10 jours de variant entre 60 et 96% aux concentrations de 0,01, 0,1 et 1 µg/L respectivement (CST 2005, p. 42). La mortalité apparaît dès le premier jour pour ces composés et évolue ensuite de façon continue, ce qui suggère qu'il n'y a pas de populations plus ou moins sensibles à ces substances.

5.4. Effets sublétaux

La littérature scientifique a assez largement exploré les effets sublétaux du fipronil au travers d'études réalisées principalement en laboratoire (par exemple le test dit du PER, Proboscis Extension Reflex (test très courant en biologie de l'abeille, voir par ex. Decourtye *et al*. 2005) ou en tunnel (comportements de butinage, d'agressivité).

5.4.1. Apprentissage, mémoire et discrimination des odeurs (PER)

Plusieurs études ont testé les effets du fipronil sur la mémoire de l'abeille par le test du PER (voir point 2.2.6. de l'introduction)

Le fipronil n'affecte pas les fonctions sensorielles et motrices mises en jeu dans le réflexe d'extension de la langue (Decourtye *et al*. 2005). Il affecte en revanche les capacités d'apprentissage, comme en attestent les études suivantes. Cette même étude a comparé les effets sur le PER de 9 pesticides dont le fipronil. Celui-ci est l'un des pesticides induisant un affaiblissement de la capacité d'apprentissage. L'étude estime la NOED pour l'abeille à 0,07 ng par abeille et par jour, sur base d'une NOEC de 2.2 µg/litre ; la NOEC pour ce comportement équivaut donc à la DL_{50}/60 (Decourtye *et al*. 2005).

El Hassani *et al* ont testé la capacité d'apprentissage après exposition orale ou topique à des doses de fipronil de 0,1ng, 0,5ng et 1 ng/abeille ; l'exposition orale n'a pas modifié sensiblement la mémoire de l'abeille ; par contre, en topique, l'exposition à 0,5 ng/abeille affecte significativement la mémoire, au contraire des deux autres doses. La

relation dose-effet n'est donc pas monotone : la courbe dans cette zone de concentrations est une courbe en cloche (El Hassani *et al*. 2005).

L'étude (Aliouane *et al*. 2009) a testé la capacité d'apprentissage (% de PER obtenus 1, 2 et 48 heures après l'entraînement après exposition orale ou topique à 0,01 ng/abeille). A cette dose le fipronil n'a pas induit d'effet sur la faculté d'apprentissage ; toutefois cette dose de fipronil dégrade la faculté de discrimination des odeurs (généralisation de l'odeur : l'abeille expose le réflexe pour une odeur différente de celle pour laquelle réflexe a été induit par apprentissage (Aliouane *et al*. 2009)).

Une application topique de 0,5 ng de fipronil par abeille diminue significativement ses capacités de discrimination et de mémoire tactile (Bernadou *et al*. 2009). L'étude, qui montre au passage que les abeilles sont capables de retenir un stimulus différent pour chaque antenne, conclut que le fipronil n'affecte pas la capacité de discrimination tactile, mais affecte en revanche la capacité de rétention mémorielle.

El Hassani *et al*. ont montré par ailleurs que les effets du fipronil sur l'apprentissage sont potentialisés par l'adjonction d'un agoniste du GABA, le TACA (*Trans*-4-Aminocrotonic Acid), ce qui s'explique par le fait que les récepteurs au GABA pourraient être d'autant plus sensibles au contaminants qu'ils sont plus ouverts (El Hassani *et al*. 2009). Les auteurs estiment que cette potentialisation devrait faire l'objet d'études d'autant plus nécessaires que le thymol, couramment utilisé dans la lutte contre la varroase, est également un agoniste du GABA (sur l'effet du thymol sur le GABA, voir Priestley *et al*. 2003).

En outre, El Hassani *et al*. ont examiné l'effet sur l'apprentissage (PER) de l'injection de deux doses de fipronil : 0,1 et 0,5 ng/abeille. La performance en rétention mémorielle après 1 et 24 heures est significativement diminuée à la dose la plus basse (0,1 ng/abeille) mais non à la dose la plus élevée (0,5 ng/abeille). Les auteurs font l'hypothèse que le fipronil est susceptible d'affecter plusieurs cibles dans les voies olfactives, de sorte qu'une dose plus élevée pourrait affecter d'autres éléments du système, et par là compenser les effets qui sont constatés à faible dose (El Hassani *et al*. 2009).

On notera que des inversions de la relation dose-effet ne sont pas exceptionnelles et se rencontrent aussi, par exemple, dans les profils de toxicité chronique de la clothanidine ou du diméthoate (source : Luc Belzunces, communication orale lors d'un cours de toxicologie au CARI, 26 février 2011).

5.4.2. Effets sur la thermorégulation

L'étude INRA 2003 *in* CST 2005 p. 47 montre l'absence d'effet aigu sur la thermorégulation du fipronil et des métabolites sulfone, sulfide et désulfinyl, que l'exposition soit aiguë ou chronique.

5.4.3. Effets sur le comportement et sur les marqueurs biologiques

Aliouane *et al*. ont montré une augmentation de l'agressivité chez les abeilles traitées aux doses de 0,1 ng par abeille et par jour et, à la fin de la période d'exposition (11 jours), à la dose de 0,01 ng par abeille et par jour. Cette agressivité se traduit par des attaques entre abeilles accompagnées d'émission de la phéromone d'alarme (Aliouane *et al*. 2009).

Une étude réalisée à l'INRA (Brunet *et al*. 2011) s'est donné pour but pour but de définir un profil toxicologique de différents composés toxiques pour l'abeille au moyen de biomarqueurs, et de relier l'évolution de ces biomarqueurs à l'apparition éventuelle de signes cliniques d'intoxication, et cela pour différentes concentrations sublétales du contaminant. Pour le fipronil, ces concentrations étaient de 0,01µg, 0,1µg et 1µg/litre. L'étude comportementale est réalisée sous tunnel. Elle montre l'apparition de troubles du comportement, avec des phases symptomatiques qui évoluent dans le temps, différemment suivant le concentrations de fipronil : agitation, agressivité avec combats

entre individus d'une même colonie[18], puis diminution de l'agitation et évolution vers un état apathique avec baisse de la fréquentation au nourrisseur. Ces résultats sont entièrement cohérents avec ceux de (Aliouane *et al.* 2009). Selon Brunet *et al.*, la baisse d'activité et l'apathie en fin de traitement pourraient être liées à la cytotoxicité relevée par Vidau *et al.* (Vidau *et al.* 2009), celle-ci enrayant le métabolisme énergétique avec pour conséquence une baisse du niveau de l'ATP.

Deux expériences successives ont été réalisées et les 4 ruches exposées à 1ppb étaient effondrées après 2 mois et 1,5 mois respectivement ; la moitié des colonies à la concentration de 0,1ppb se sont également effondrées.

Ces résultats sont cohérents avec une étude antérieure (Colin *et al.* 2004) qui montre une baisse drastique de fréquentation au nourrisseur à la concentration de 2ppb, ainsi que des symptômes clairs d'intoxication : convulsions, paralysies, et difficulté pour les butineuses à retrouver l'entrée de la ruchette.

5.4.4. Autres effets

Aliouane *et al.* ont montré une consommation accrue d'eau après traitement topique par 0,01 ng/abeille. Cet accroissement est important et a perduré pendant toute une semaine d'observation (voir fig. 2 de l'étude) (Aliouane *et al.* 2009). La même étude montre qu'une dose 0,01 ng/abeille par voie orale diminue significativement la réponse au sucrose en faible concentration ; l'application topique de la même dose n'affecte pas la sensibilité au sucrose. (El Hassani *et al.* 2005) montre une légère décroissance de la réponse au sucrose après ingestion de 0,01 et 0,5 ng/abeille de fipronil, ainsi qu'après l'application topique de 1 ng/abeille (mais aucun effet aux doses moindres en topique).

Aliouane *et al.* toujours ont également montré une diminution de l'activité locomotrice après application topique de 0,01 ng/abeille ; la même dose par voie orale ne modifie pas l'activité locomotrice des abeilles (Aliouane *et al.* 2009).

L'ACTA a réalisé une étude de la durée de vol sous tunnel : des abeilles préalablement contaminées ou non au fipronil (1,5 ; 0,3 ; 0,06 ng/abeilles) ont été amenées à voler sous tunnel entre leur ruche et le nourrisseur. L'étude note : *aucune abeille traitée avec 1,5ng de fipronil n'a réalisé le trajet de la ruche au nourrisseur (ou inversement bien sûr). Etant donné les symptômes observés après ce traitement (abeilles traînantes, tremblements, mouvements désordonnés), il paraît alors évident que dans un premier temps les abeilles recevant cette dose n'ont pas été en mesure de voler, puis sont mortes dans les 24 h.* Par ailleurs, les durées de vols sont affectées aux doses inférieures, avec une relation dose-effet positive (41% des vols inférieurs à 10s dans les témoins, contre 30% chez les abeilles traitées à 0,06ng et 27% chez les abeilles traitées à 0,3ng. *Parallèlement, la proportion des vols dépassant 30s est nettement supérieure chez les abeilles traitées avec 0,3ng de fipronil par rapport à celle des abeilles non traitées (50% versus 20%)* (ACTA 2006).

Le CST quant à lui a analysé 7 études relatives aux effets observés sous tunnel par butinage du tournesol (CST 2005). Trois de ces études montrent que, si le fipronil n'a pas d'effet sur le comportement de butinage, d'autres effets sont apparus lors du butinage sous tunnels traités: augmentation du nombre d'abeilles paresseuses et de la nourriture stockée, du toilettage généralisé, et surtout une série de signes d'intoxication (abeilles suspendues, tombantes, paralysie des membres et de l'abdomen). L'étude montrant ces signes d'intoxication (Giffard 2003) a été validée par le CST ; les deux autres n'ont pas été validée, l'une pour cause de mortalité dans les témoins, l'autre parce que les tunnels n'avaient pas la dimension requise (CST 2005 pp. 48 – 50). Ces études n'ont permis de fixer ni NOEC ni NOEL.

[18] Ces combats, qui ont lieu notamment au nourrisseur, peuvent aller jusqu'à la décapitation (L. Belzunces, communication orale).

Le CST a également examiné 7 études en champ et n'en a validé aucune, essentiellement à cause des problèmes de contrôle : les champs témoins étaient trop éloignés des champs traités (différence de conditions de butinage) ou au contraire trop proches des champs traités, ou encre trop proches de champs traités à avec d'autres substances, en particulier le Gaucho® (CST 2005). Il n'en reste pas moins que des effets sur le butinage ont été observés dans plusieurs études, avec une dégradation des performances de la récolte (étude M157 p. 52, M308 p. 53 notamment ; la rédaction du rapport n'est pas claire par rapport à l'apparition d'effets dans chaque étude).

Une étude réalisée en 2002 (Font 2002) a comparé sur séquences vidéo le comportement d'abeilles butinant deux champs, l'un traité Régent TS®, l'autre non traité, dans la vallée de la Save en Haute-Garonne (France). Cette étude montre une différence significative entre le comportement des abeilles sur champ traité et celui sur champ témoin, et ce pour tous les comportements observés : chute du temps utilisé pour l'acte de récolte, accroissement de temps d'immobilité, augmentation du nombre de chutes d'abeille du capitule au fur et à mesure de la maturation du tournesol, augmentation du nombre d'abeilles effectuant un toilettage généralisé, davantage de butinage hors zone sur l'inflorescence ; au total, 25% du temps utilisé par l'abeille sur le champ est utilisé pour la récolte dans le champ traité, contre plus de 80% dans le champ de contrôle (p. 34). Le temps de toilettage, qui est de 1% sur le champ de contrôle, atteint 25% sur le champ traité en fin de floraison (p. 36).

Le fipronil fait partie des molécules hautement toxiques pour l'abeille (DL_{50} < 1,99 µg/abeille). Toutefois, si sa toxicité aiguë est élevée, c'est surtout sa toxicité par exposition chronique de l'abeille qui est forte, qu'il s'agisse de ses effets létaux ou sublétaux. Les effets sublétaux touchent la faculté d'apprentissage, la discrimination des odeurs et des teneurs en sucre, la locomotion, les facultés d'orientation et le niveau d'activité ; l'intoxication au fipronil se manifeste d'abord par une activité forte, avec agressivité, puis par une apathie s'installant progressivement jusqu'à l'arrêt d'activité. Elle est accompagnée de signes d'intoxication visibles au butinage (présence sur des parties on pertinentes de la fleur etc.). Certains de ces effets sublétaux apparaissent à des doses indétectables à l'analyse (<0,1ppb).

5.5. Effets sur les larves

Dans son avis de 2007 sur l'évaluation communautaire du fipronil (AFSSA 2007), l'AFSSA note : (..) *du fait de l'absence d'étude de toxicité sur les larves, il n'est pas possible de savoir si la limite de quantification utilisée lors des essais [0,5 µg/kg, NDLR] est suffisamment basse pour évaluer les risques*. L'AFSSA conclut à la nécessité, pour les Etats membres, d'évaluer *les risques pour les abeilles s'il s'avérait que le niveau d'exposition des abeilles de la ruche et plus particulièrement des larves, bien que très faible, soit susceptible de représenter un risque*.

Nous n'avons pas connaissance d'autres données relatives à la toxicité du fipronil pour le couvain d'abeilles.

5.6. Synergies avec d'autres molécules

5.6.1. Avec les fongicides azoles

Un brevet déposé par Rhône-Poulenc (Colliot *et al.* 1999) vante les propriétés synergiques des mélanges entre phénylpyrazoles et fongicides azoles. Le fipronil est expressément nommé parmi les insecticides visés. Le brevet insiste sur le fait que l'action résultant de la présence conjointe des deux substances n'est pas une simple association mais bien une synergie véritable, qui va dans les deux sens : *D'une façon inattendue, les associations selon l'invention sont supérieures à ce qu'on pouvait en attendre, en ce sens qu'au-delà de la simple complémentarité des deux composés, le fongicide, outre son action propre,*

agit comme un synergiste de l'insecticide. (…) De plus, les associations selon l'invention présentent également la caractéristique tout à fait surprenante que l'insecticide agit comme un synergiste du fongicide (lignes 28 à 30 et 36 à 38 de la version française).

Cette propriété est décrite comme particulièrement intéressante lorsque les associations concernées sont appliquées en traitement de semences : *De manière préférée les associations sont utilisables pour la protection des semences ou en traitement de sol* (lignes 40 et 41 de la version française).

Les fongicides cités sont tout à fait courants et les mélanges cités en exemple par le brevet sont extrêmement ubiquistes.

5.6.2. Avec le piperonyl butoxide

Le piperonyl butoxide (PBO, inhibiteur de la cytochrome oxydase P450) multiplie par 7 le pouvoir insecticide du fipronil sans affecter celui du désulfinyl-fipronil (Hainzl & Casida 1996 ; Hainzl *et al.* 1998). Le PBO est usuellement utilisé comme synergiste des carbamates, des pyréthrines et des pyréthrinoïdes ; il en sera plus longuement question dans la partie relative à ces substances.

5.6.3. Avec les substance agissant sur la neurotransmission cholinergique.

Chez les insectes, le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur agissant sur les neurones cholinergiques. Or, les néonicotinoïdes ont pour effet de provoques la sur-activation des neurones cholinergiques. Parce qu'il supprime l'inhibition par le GABA, le fipronil est un synergiste potentiel des néonicotinoïdes. Le mélange incluant un néonicotinoïde et le fipronil, additionné éventuellement de fongicides, fait l'ailleurs l'objet d'un brevet (Jamet *et al.* 2011).

On relèvera que les neurones cholinergiques sont d'une particulière importance chez l'abeille : ils interviennent dans les mécanismes sensoriels et surtout sont un neurotransmetteur majeur des corps-champignons (mushroom bodies), qui sont les centres d'intégration du cerveau de l'abeille. Ils jouent un rôle essentiel dans les fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire, la navigation, la discrimination des formes, des odeurs et des couleurs… (cf. entre autres Giurfa 2003).

5.7. Synergies avec les agents pathogènes

(Vidau *et al.* 2011) montre l'existence d'une synergie entre l'infection par *Nosema ceranae*[19] et l'intoxication au fipronil : des abeilles en cagette ont été artificiellement infectées par *N.ceranae* (inoculum de 125 000 spores par abeille). Après 10 jours d'infection les abeilles ont été alimentées avec des solutions de sucrose (témoin) ou de sucrose contaminé à dose sublétale par deux insecticides dont le fipronil. Au jour 20 de l'étude, les abeilles soumises uniquement à l'infection par *N.ceranae* présentent une mortalité de 49% alors que celles soumises à l'infection et à une dose sublétale de fipronil (143,5 ± 1,5 pg/abeille) montrent un taux de mortalité de 82%.

Le fipronil est un synergisant d'autres substances utilisées soit comme biocides (néonicotinoïdes) soit comme produits phytopharmaceutiques (néonicotinoïdes, piperonyl butoxide, fongicides azoles). Il a pour effet de fragiliser l'abeille face à certains pathogènes comme les microsporidiens du genre *Nosema*

[19] *Nosema* est un microsporidien très présent, à l'échelle mondiale, dans les colonies d'abeille dont il parasite le tube digestif. Deux de ses espèces infectent l'abeille mellifère : *Nosema apis* et *Nosema ceranae* ; la distinction entre les deux espèces n'a été faite que récemment, grâce aux techniques d'identification fondées sur la génétique (PCR). Ce pathogène redoutable est en fait un opportuniste qui tend à se développer lorsqu'un facteur tiers affecte la colonie, qu'il soit d'ordre alimentaire, sanitaire ou autre.

6. Risques des biocides à base de fipronil pour l'abeille

Les usages biocides du fipronil en Belgique sont limités à la lutte contre les blattes et les fourmis. Huit produits sont autorisés, ils sont listés dans le tableau Excel figurant en annexe. Aucun d'entre eux n'est classé ni ne porte le pictogramme « dangereux pour l'environnement ». Tous sont autorisés en usage domestique (sauf peut-être Goliath gel qui est d'usage professionnel dans le feuillet émanant de la Compagnie, sans que cette mention soit présente dans l'acte d'autorisation).

6.1. Les actes d'autorisation

Un coup d'œil sur les actes d'autorisation permet de voir que les phrases de risque relatives à ces produits, et concernant l'environnement, portent

- sur la toxicité pour les milieux aquatiques (R52/53 : Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique)
- sur les modes d'élimination S56 (Eliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux) ou S60 (éliminer le produit et son récipient comme déchet dangereux)

Deux remarques à propos de ces phrases de risque :

- la phrase de risque R52/53 est d'application pour tous les produits sauf deux, le granulé soluble KB Fourmis SG et KB-fourmis prêt à l'emploi.
- deux des produits sont des gels appâts : Goliath (blattes) et KB fourmis appât gélifié. Tous deux sont à même concentration (0,05% de fipronil). Les phrases de précaution sont plus drastiques pour le premier (S 60, S 61 (éviter le rejet dans l'environnement)) + « ne pas utiliser à l'extérieur ») que pour le second pour lequel S56 s'applique, comme pour tous les autres produits à base de fipronil ; Il se peut qu'il y ait à cela des raison (par exemple le fait que les substances de formulation soient différentes et que donc les formulations aient des toxicités différentes, ou plus vraisemblablement que Goliath gel soit destiné à l'usage professionnel).

6.2. Exposition de l'abeille aux biocides à base de fipronil utilisés en Belgique

L'exposition de l'abeille au fipronil est susceptible de se faire par deux voies différentes :

- l'absorption de nectar, de pollen ou d'eau contaminés lors du butinage ou lors de la consommation des ressources emmagasinées dans la ruche (pour ce qui concerne le nectar et le pollen, car l'eau n'est jamais mise en magasin)
- l'absorption de substances ou le contact avec des substances (air, eau, nourriture) contenant la substance ou ses métabolites par un phénomène de contamination générale de l'environnement. Cette contamination générale n'est en effet pas à exclure, du moins dans certaines zones, comme le montrent certaines études répertoriées ci-dessus (notamment Chauzat *et al.* 2006, Le Faouder *et al.* 2007, Mahler *et al.* 2009, les études ORAMIP).

L'exposition liée à l'usage de produits biocides en Belgique paraît ressortir principalement à la seconde catégorie ; les produits de lutte contre les fourmis et les blattes sont censés s'utiliser principalement dans les locaux fermés où les abeilles ne sont pas censées pénétrer, sur les terrasses, aux angles des maisons... mais des ruissellements peuvent se produire et l'usage du fipronil dans des biocides de ce type est suspecté dans le cas de certaines contaminations (bassin d'Arcachon, étude Mahler *et al.* 2008).

L'usage du fipronil en biocide n'est donc pas à exclure d'emblée des causes possibles de contamination de l'abeille, vu son caractère ubiquiste et sa présence large dans l'air et

dans l'eau. Toutefois, une contamination significative par les biocides n'est vraisemblable que dans les contrées où ceux-ci sont utilisé en quantités importantes, ce qui est le cas dans les régions où s'impose la lutte contre les termites ou contre les fourmis de feu, mais pas en Belgique où il n'y a pas à lutter contre ces insectes. En Belgique, l'usage du fipronil est biocide est actuellement réduit, en contraste avec son usage phytosanitaire: en 2008, il s'est vendu 1192 fois plus de fipronil en tant que phytosanitaire qu'en tant que biocide.

6.3. Recommandations

Cela dit, aucun apport de fipronil n'est à négliger vu la toxicité de la molécule. 1 kg de fipronil (1. 10^{12} ng) suffit à tuer 250 10^{6} abeilles par intoxication aiguë, soit 5000 colonies en pleine saison… en intoxication chronique, on est sans doute à 40 fois ce chiffre. De tels calculs sont purement théoriques bien évidemment, mais ils permettent d'appréhender le fait que des quantités même minimes de tels produits peuvent ne pas rester sans effet, vu leur toxicité.

1. Vu ce qui est dit ci-dessus, nous faisons les recommandations suivantes (celles qui suivent sont spécifiques au fipronil, pour le surplus, voir les conclusions générales):

- Il serait prudent d'indiquer sur les produits type KB Fourmis prêt à l'emploi, susceptible d'être utilisé sur les pelouses, que le produit contient une substance toxique pour les butineurs, et capables de pénétrer dans les plantes, afin d'éviter que ces produits soient utilisés sur les gazons fleuris (trèfles, pissenlits…) par exemple. La phrase pourrait être : *Attention, la matière active de ce produit (fipronil) est toxique pour les abeilles et les insectes utiles. Ne pas utiliser en milieu extérieur dans les endroits où le butinage est possible (pelouses par exemple).*
- Tous les produits (hormis peut-être les boîtes-appâts, à discuter) devraient porter le pictogramme N, la phrase de risque R57 et une mention de type « attention, ce produit est aussi toxique pour les insectes utiles ».

Bibliographie

Aajoud A, Raveton M, Azrou-Isghi D, Tissut M and Ravanel P, 2008: How Can the Fipronil Insecticide Access Phloem?, J. Agric. Food Chem., 56 (10), pp 3732–3737

ACTA, 2006: Mise au point d'une méthodologie visant à évaluer les effets sublétaux de products phytopharmaceutiques sur l'orientation de l'abeille domestique, Action Orientation, rapport 2006, auteurs: Decourtye A et Tisseur M.

AFSSA, 2007: AVIS de l'Agence franc□aise de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation communautaire de la substance active fipronil, dossier n°2006-SA-0330, 22 mars 2007

Aliouane Y, el Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M and Gauthier M, 2009: Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior, Environmental Toxicology and Chemistry 28 (1): 113–122

Aufauvre J, Biron DJ, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F and Blot N, 2012 : Parasite-insecticide interactions: a case study of Nosema ceranae and fipronil synergy on honeybee, SCIENTIFIC REPORTS 2 326, Doi: 10.1038/srep00326

Balança G and de Visscher MN, 1997: Effects of very low doses of Fipronil on grassshoppers and non-target insects following field trials for grasshoppers control, Crop Protection 16 (6): 553 - 564

Bedienta PB, Horsakb RD, Schlenkc D, Hovingaa RM and Piersona JD, 2005 : Environmental Impact of Fipronil to the Louisiana Crawfish Industry, Environmental Forensics 6 (3) : 289 – 299

Bernadou A, Démares F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC and Gauthier M, 2009: Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee, Journal of Insect Physiology 55, 1099–1106

Bonmatin, J. M.; Marchand, P. A.; Cotte, J. F.; Aajoud, A.; Casabianca, H.; Goutailler, G. and Courtiade, M., 2007: Bees and systemic insecticides (Imidacloprid, Fipronil) in pollen: subnano-quantification by HPLC/MS/MS and GC/MS, Environmental fate and ecological effects of pesticides 2007 (proceedings of the 13th Symposium Pesticide Chemistry, Piacenza, Italy, 3-6 September 2007): pp. 827-834

Bortolotti L, Sabatini AG, Mutinelli F *et al*, 2009: Spring honeybee losses in Italy, Hazards of Pesticides to Bees - 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group Proceedings, Julius-Kühn-Archiv 423: 148-152

Brunet JL, Tchamitchian S, Kairo G, Guillot P, Badiou A, Zitouni G, Cousin M et Belzunces LP, 2011: *Action des pesticides a faibles doses chez l'abeille : approche multimarqueurs d'exposition, in* Jean-Marie Barbançon et Monique L'Hostis, Ed., Journée Scientifique Apicole, Arles, 11 février 2011, pp 65-70

Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N and Aubert M, 2006: A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France, J. Econ. Entomol. 99 (2): 253 - 262

Colin, ME, Bonmatin JKM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP, 2004: A method to quantify and analyse the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides, Arch. Environn. Contamin. Toxicol. 47: 387– 95

Colliot F, 1997 pour Rhône-Poulenc : Patent EP 0 726 709 B1, 3 décembre 1997, disponible sur le Net : http://www.freepatentsonline.com/EP0726709.pdf

Conelly P, 2001: Environmental fate of Fipronil, California EPA, available online: http://www.fluoridealert.org/pesticides/fipronil.ca.epa.2001.pdf

CST, 2005: Comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles, rapport, décembre 2005: Fipronil utilisé en enrobage de semences (Régent TS®) et trouble des abeilles, Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la pêche de la République française

Das PC, Cao Y, Cherrington N, Hodgson E and Rose RL, 2006: Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. Chemico-Biological Interactions 164, 200–214

Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., Pham-Delègue, M.H., 2005: *Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning Performances of the Honeybee* Apis mellifera, Arch. Environ. Contamin. Toxicol. **48**, 242 – 250

Demchek DK and Skrobialowski SC, 2003: Fipronil and degradation products in the rice-producing areas of the Mermentau River Basin, Louisiana, February-September 2000, USGS Fact Sheet FS-010-03, March 2003

DRAF - SRPV 2003: Etude des rejets potentiels de poussières issues de semences de tournesol traitée « Régent TS » par les semoirs pneumatiques, étude préliminaire. Document disponible sur le Net: http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Fipronilete03.pdf.

El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M and Armengaud C, 2005: Effects of sublethal doses of Fipronil on the behavior of the honeybee (Apis mellifera), Pharmacology, biochemistry and behavior 82 (1): 30-39

El Hassani AK, Dupuis JP, Gauthier M and Armengaud C, 2009: Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee, Invert. Neurrosci. 9 (2): 91-100

EFSA, 2006: Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil, EFSA Scientific Report 65, 110 pp.

Font C, 2002: Etude des effets du traitement systémique des semences de tournesol sur le comportement de récolte des abeilles, étude financée par l'ADAM, non publié.

Forster R, 2009: Bee posoining caused by insecticidal treatment of maize in Germany in 2008, Julius-Kühn Archiv 423: 126-133

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Greatti M, Giorio C, Marton D and Tapparo A, 2011: Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication, J. Appl. Entomol., DOI: 10.1111/j.1439-0418.2011.01648

Giurfa M, 2003: The amazing mini-brain: lessons from a honey bee, Bee World 84(1): 5–18

Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F and Tjeerdema R, 2007: Environmental fate and toxicology of fipronil, Journal of Pesticide Science, 32 (3): pp.189-199

Gunasekara AS and Troung T, 2007: Environmental fate of fipronil, California Environmental Protection Agency Sacramento, CA 95812, USA, disponible sur le Net : http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/fipronilrev.pdf

Hainzl D and Casida JE, 1996: Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with rétention of neurotoxicity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 : 12764 – 12767

Hainzl D, Cole LM, and Casida JE, 1998: Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and Its Sulfone Metabolite and Desulfinyl Photoproduct, Chem. Res. Toxicol., 1998, 11 (12), pp 1529–1535

IFREMER 2007: Etat de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. Impact environnemental. Accessible en ligne: http://archimer.ifremer.fr/doc/2007/rapport-2398.pdf

INRA 2003: Rapport d'étude du programme: Impact de la contamination du miel par le Fipronil sur l'activité et la survie des abeilles : aspects physiologiques et analytiques. Programme communautaire sur l'apiculture, année 2003. Laboratoire de toxicologie environnementale, INRA d'Avignon, responsable de l'étude: Luc P. Belzunces.

Jamet L, Gehrart RW and Voeste D, 2011 for BASF SE (Ludwighaven): US Patent Application US 2011/0046123 A1, disponible sur le NET: http://www.freepatentsonline.com/y2011/0046123.html

Le Faouder J, Bichona E, Brunschwig P, Landellec R, Andrea F and Le Bizeca B, 2007: Transfer assessment of Fipronil residues from feed to cow milk, Talanta 73 (4), : 710-717

Mahler B, Van Metre P, Wilson JT et al., 2009: Fipronil and its Degradates in Indoor and Outdoor Dust, Environ. Sci. Technol. 43: 5665–5670

Modra H and Svobodova Z, 2009: Incidence of animal poisoning cases in the Czech Republic: current situation, Interdisc Toxicol. 2(2): 48–51

Narahashi T, Zhao X, T Ikeda T, Nagata K, and Yeh JZ, 2007: Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity, Hum Exp Toxicol. 2007 April; 26(4): 361–366 (doi: 10.1177/0960327106078408)

ORAMIP, 2004: recherche du Fipronil dans l'air ambiant en limite de parcelles, rapport disponible sur Internet: http://www.oramip.org/backoffice/classeur/showCarte.php?id=129&bugMoz=0

ORAMIP, 2005: Evaluation des concentrations en phytosanitaire en secteur arboricole, rapport disponible sur Internet

http://www.oramip.org/backoffice/classeur/showCarte.php?id=319&bugMoz=0

Priestley C, Williamson EM, Wafford KA and Sattelle DB, 2003: Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human $GABA_A$ receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from Drosophila melanogaster, British Journal of Pharmacology 140: 1363–1372

da Silva Cruz A, da Silva-Zacarin EC, Bueno OC, Malaspina O, 2010 : Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (Apis mellifera L.) larvae, Cell Biol Toxicol 26(2):165-76

Tapparo A, Marton D, Giorio C, Zanella A, Solda L, Marzaro M, Vivan L and Girolami V, 2012: Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds, Environ Sci Technol, 46(5): 2592-9, DOI: 10.1021/es2035152

TDC Environmental, 2007: Urban Use of the insecticide Fipronil, TDC 4020 Bayview Avenue San Mateo CA 94403, disponible sur le Net: http://www.up3project.org/documents/Final_Fipronil_Memo_2007.pdf

US Geological Survey (USGS) 2004: Environmental Setting, Water Quality, and Ecological Indicators of Surface-Water Quality in the Mermentau River Basin, Southwestern Louisiana, 1998-2001 (Authors: Skrobialowski SC, Mize SV and Demcheck DK), disponible sur le NET : http://la.water.usgs.gov/publications/pdfs/WRI_03-4185.pdf

Vidau C, Brunet JL, Badiou A and Belzunces LP, 2009: Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2, Toxicology in Vitro 23: 589–597

Vidau C, Paris L, Viguès B, Aufauvre J, Fontbonne R, Blot N, Diogon M, Texier C, El Alaoui H, Brunet JL, Belzunces LP et Delbac F, 2011: Effets d'une infection par Nosema ceranae sur la sensibilité des abeilles à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride in Jean-Marie Barbançon et Monique L'Hostis, Ed., Journée Scientifique Apicole, Arles, 11 février 2011, pp 28-34

Walse SS, Pennington PL, Scott GI and Ferry JL, 2004: the fate of Fipronil in modula estuarine mesocosms, J. Environ. monit. 2004 (6): 58 – 64

Wirth EF, Pennington PL, Lawton JC, DeLorenzo ME, Bearden D, Shaddrix B, Sivertsen S and Fulton MH, 2004: The effects of contemporary-use insecticide (Fipronil) in an estuarine mesocosm, Environmental Pollution 131: 365 – 371

Ying GG and Kookana S, 2006: Persistence and movement of Fipronil termiticide with under-slab and trenching treatments, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 25, No. 8, pp. 2045–2050

Zhao X, Salgado V, Yeh J and Narahashi T, 2003: Differential action of Fipronil and Dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in Cocroach neurons, The Journal of Pharmaclology and Experimental Therapeutics 306 (3) : 914-924

Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL and Narahashi T, 2005: Sulfone metabolite of fipronil blocks - aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 314 : 363–373

Imidaclopride

1. Nature et mécanisme d'action

L'imidaclopride est un insecticide de la classe des néonicotinoïdes. C'est un insecticide à large spectre, et qui se prête aux modes d'utilisation les plus divers. Il est utilisé en tant que biocide (traitement contre les fourmis et les termites par exemple), en usage vétérinaire (colliers de chiens et de chats anti-puces) ainsi qu'en traitement de protection des plantes, en pulvérisation ou en traitement des semences.

1.1. Propriétés physico-chimiques

L'imidaclopride est un néonicotinoïde, une molécule proche par sa structure et son action de la nicotine. Il existe actuellement, en gros, deux classes de néonicotinoïdes, les nitro-substitués (les molécules portent un groupe nitro- (nitrométhylène ou nitroimine)), et les cyano-substitués (les molécules portent un groupe cyano- (cyanoimine)) (Matsuda *et al.* 2001). Ces groupes nitro ou cyano sont indispensables à l'activité insecticide de la molécule et en déterminent largement les propriétés (Tomisawa & Casida 2005). Imidaclopride, clothianidine, thiamethoxam, dinotefurane appartiennent au premier groupe et sont très toxiques pour l'abeille avec une DL_{50} de l'ordre du ppb. Acétamipride et thiaclopride appartiennent au second groupe et sans être anodins, ont une toxicité aiguë par voie orale plusieurs centaines de fois moindre (DL_{50} de 8,09 μg/ab et de 17,32 μg/ab respectivement (Footprint 2012)) ; ces molécules sont détoxifiées par l'abeille qui les oxyde en composés non toxiques, ou quasiment non toxiques pour l'abeille (Iwasa *et al.* 2004)[20], une détoxification que l'abeille ne peut opérer pour les nitro-substitués.

La molécule d'imidaclopride est composée de deux cycles assemblés : un cycle chloropyridine et un cycle imidazolidine qui porte le groupement nitro- (une nitroguanidine, c'est à dire un groupement $-C=NNO_2$). Les deux parties de la molécule joueraient un rôle particulier dans la toxicité pour l'abeille, particulièrement au niveau des relations entre toxicité aiguë et toxicité chronique de la molécule-mère et de ses métabolites (voir point 5.6.2. ci-dessous). La présence d'un halogène (Cl-) sur le groupement pyridine a pour effet de ralentir la dégradation de celui-ci[21], ce qui contribue à la persistance de la molécule.

Avec un log Pow de 0,57 (CPR[22] p. 60), l'imidaclopride est, comme les autres néonicotinoïdes, une molécule hydrophile, hautement soluble dans l'eau. Sans surprise, il est donc aussi hautement systémique dans les plantes : celles-ci l'absorbent facilement à partir du sol ou de l'enrobage de la semence et la substance se répartit dans toute la plante, subissant peu à peu une métabolisation du même type que lors d'applications foliaires. Son potentiel de lixiviation, dont on s'attendrait à ce qu'il soit lui aussi élevé, est plus controversé (Tisler *et al.* 2009).

1.2. Propriétés insecticides

Tout comme la nicotine, l'imidaclopride est un neurotoxique et ses propriétés insecticides sont fondées sur sa neurotoxicité : il agit comme agoniste de l'acétylcholine au niveau des

---

[20] La toxicité de ces molécules est d'autant moins anodine, qu'elle est puissamment potentialisée par certains synergistes tels le piperonyl butoxyde ou les fongicides azoles. Le thiacloprid est ainsi 1141 fois plus toxique pour l'abeille (toxicité de contact) en présence de triflumizole, que seul; la synergie ne poserait toutefois pas de problème aux concentrations recommandées pour ces deux substances en usage commercial (Iwasa *et al.* 2004). En outre, certains métabolites sont toxiques par exposition chronique. L'un des métabolites de l'acétamipride, par exemple, est l'acide 6-chloronicotinoque (Footprint 2012), métabolite commun à l'acétamipride et à l'imidaclopride, dont la toxicité aiguë pour l'abeille est faible, mais dont la toxicité chronique égalerait celle de l'imidaclopride et de ses métabolites toxiques (voir points 5.3.2. et 5.6.2. ci-dessous)

[21] source : thème « 2-chloropyridine » dans la version anglaise de Wikipedia, consultation 31/7/2012

[22] La CPR est a Conclusion on the Peer review, le document de synthèse produit par l'EFSA dans le cadre de l'autorisation de la molécule en tant que produit phytosanitaire (réf. EFSA 2008).

récepteurs nicotiniques postsynaptiques dans le système nerveux central – en fait, il se lierait aux mêmes sites que l'acétylcholine dans les récepteurs nicotiniques (Nagata *et al.* 1998, Déglise *et al.* 2002). Il a donc pour effet une excitation persistante des neurorécepteurs cholinergique, conduisant à une hyperactivité neuronale, un dysfonctionnement qui aux doses utilisées en usage insecticide cause la mort de l'insecte. Le blocage est quasiment irréversible (Abbink 1991).

L'intérêt des néonicotioïdes vient surtout de la grande spécificité des nitrosubstitués, qui se lient bien plus facilement aux récepteurs cholinergiques de l'insecte qu'à ceux des mammifères, et sont donc bien plus toxiques pour les premiers que pour les seconds. L'imidaclopride est ainsi 700 fois moins toxique pour les mammifères que l'est la nicotine, dont la molécule a pourtant la même structure (Elbert *et al.* 1998 *in* Sur & Storck 2003). Toutefois, l'imidaclopride est dénitrifié lors de la métabolisation par les plantes et les animaux, et le dénitro-imidaclopride est quant à lui plus toxique pour les vertébrés que pour les insectes (Matsuda *et al.* 2001).

Les récepteurs cholinergiques sont très répandus dans le système nerveux de l'abeille et notamment, au niveau du cerveau, dans les lobes antennaires et les calices des corps champignons, la partie sommitale du cerveau qui abrite les centres d'intégrations et joue donc un rôle fondamental dans les processus cognitifs (revu par Belzunces *et al.* 2012).

L'action de l'imidaclopride sur les récepteurs cholinergiques nicotiniques n'est pas univoque, et à côté de son action agoniste, l'imidaclopride agit également en antagoniste sur certains de ces récepteurs cholinergiques, une ambivalence qui pourrait être due au fait que la molécule se lie, avec des affinités différentes, à deux sites différents, l'un produisant l'action agoniste principale et l'autre produisant une action accessoire de blocage (Nagata *et al.* 1998, étude faite sur des cellules de rat). Des études électrophysiologiques portant sur une préparation de lobes antennaires d'abeilles ont montré quant à elles la présence de deux populations neuronales avec lesquelles la molécule aurait une égale affinité, mais sur lesquelles elle agirait différemment, tantôt totalement agoniste, tantôt partiellement agoniste (Nauen *et al.* 2001b). Enfin, la molécule agirait uniquement comme antagoniste sur des cellules neuromusculaires chez la grenouille (Seifert et Stollberg 2005).

Cette action n'est pas davantage unique : l'imidaclopride agit également sur les récepteurs GABAergiques, où il se comporte en antagoniste du GABA, le neurotransmetteur des neurones inhibiteurs, ce qui pourrait ajouter un mécanisme à son action insecticide (Déglise *et al.* 2002 ; Thany 2010 *in* Eiri & Nieh 2012).

Enfin les néonicotinoïdes agissent en synergie avec certains microchampignons (fungi), parasites opportunistes des insectes, tels *Beauveria bassania* et *Metarhizium anisopliae* ; ils sont utilisés à cette fin dans la gestion intégrée des pestes (Alaux *et al.* 2009) ; une propriété qu'il n'est pas inutile de noter car la ruche est le siège de plusieurs espèces de fungi opportunistes, notamment les deux citées ci-avant.

Tout ce qui précède confirme la complexité des mécanismes toxiques mis en œuvre par la molécule et ses métabolites.

1.3. Toxicité pour l'abeille

Les néonicotinoïdes sont classés « hautement toxiques pour l'abeille » ; la DL_{50} par exposition aiguë est de l'ordre du ng/abeille, et la détection et la quantification de doses de cet ordre dans le sol, les plantes et les matrices apicoles a nécessité la mise au point de méthodes nouvelles d'extraction et d'analyse chimique (Bonmatin *et al.* 2003). Les néonicotinoïdes nitrosubstitués se caractérisent donc par une DL_{50} plus basse que celle des autres classes d'insecticides, organophosphorés, pyréthrinoïdes et carbamates (revu par Decourtye & Devillers 2010). Ils sont notamment plus toxiques que les substances usuellement utilisées comme standards toxiques, tels le diméthoate, ce qui pose problème

car de ce fait il n'existe pas à ce jour de standard toxique utilisable dans les tests de toxicité portant sur ces molécules. La toxicité orale est supérieure à la toxicité par contact, ce qui mérite d'être noté dans la mesure où l'exposition de l'abeille est orale lorsque la substance est utilisée en traitement de semences (présence de la molécule-mère et de métabolites dans le nectar, le pollen ou l'eau).

De très nombreuses études en laboratoire, en tunnel et en champ ont été publiées, qui concernent les effets de l'imidaclopride sur les abeilles, qu'ils soient létaux ou sublétaux, aigus ou chroniques. Ces articles ont fait l'objet de revues (notamment Blacquière *et al.* 2012, Decourtye & Devillers 2010) et d'une méta-analyse (Cresswell 2010). Les effets toxiques de cette substance ont également fait l'objet d'études en champ, qu'ils s'agissent d'essais expérimentaux (Faucon *et al.* 2005, Colin *et al.* 2004) ou de monitorings (Nguyen *et al.* 2009), dont les résultats sont largement divergents : Colin *et al.* ont montré l'existence d' effets sublétaux, les études de Faucon *et al.* et Nguyen *et al.* montreraient plutôt un effet positif de l'imidaclopride sur les colonies, qui pourrait être mis en relation avec l'effet dynamisant de l'imidaclopride aux très faibles doses (voir point 5.5.1. ci-dessous).

La toxicité aiguë et chronique, létale et sublétale, de l'imidaclopride pour les abeilles, et les particularités de cette toxicité, sont largement détaillées ci-dessous.

1.4. Usages

L'imidaclopride est une substance active utilisée en tant que biocide, médicament vétérinaire ou produit phytosanitaire.

En usage biocide, la molécule permet sert de base à des boîtes-appâts anti-fourmis (FourmiBox), en granulés, appât mouillable contre les mouches (Quick Bayt), en gel pour la lutte contre les cafards (Maxforce White IC) et en plaquettes insecticides à usage domestique (Vapona window sticker anti-mouche), tous produits par Bayer CropScience, qui a mis au point la molécule.

En usage vétérinaire, la molécule s'utilise en colliers antiparasitaires pour chiens et chats (Seresto).

En usage phytopharmaceutique, l'imidaclopride est utilisé en traitement de semences, en injection dans les troncs des arbres, en irrigation au goutte-à-goutte, par trempage des racines au repiquage, en pulvérisation ou en usage mixte (traitement au repiquage puis traitements fractionnés par irrigation) (Dively & Kamel 2012).

2. Devenir et comportement dans l'environnement

Les principaux métabolites de l'imidaclopride sont (Nauen *et al.* 2001b, Sur & Stork 2003, Laurent & Rathahao 2003):

- issus de l'hydroxylation, les hydroxy-imidacloprides (4-hydroxy- (M02), 5-hydroxy-, 4,5-hydroxy-imidaclopride (M01) et finalement le radical 5-hydroxy (conjugué) et l'oléfine (M06)
- issus de la réduction, la nitrosimine (M07), la guanidine, le desnitro-imidaclopride (M09) et finalement l'urée (M12) – celle-ci est le produit de dégradation majeur par photolyse (Wamhoff & Schneider 1999)
- issus de l'oxydation, le radical chloropycolyl (conjugué) et l'acide 6-chloronicotinique (M14)

Cf. figures page suivante (source : Sur & Stork 2003).

Plusieurs voies de métabolisation sont donc possibles en fonction des conditions du milieu.

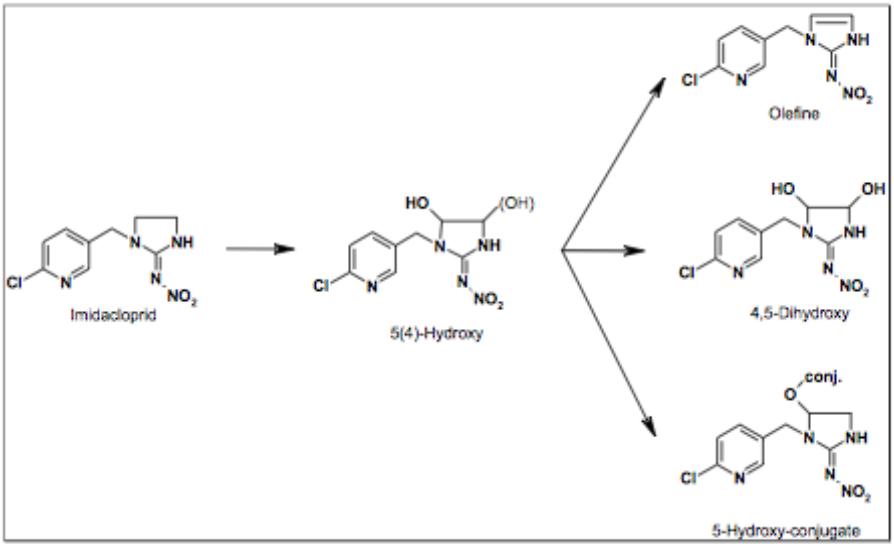


Figure 1. Metabolism of imidacloprid (I): ethylene-bridge hydroxylation of the imidazolidine ring and elimination of water.

Source : Sur & Stork 2003

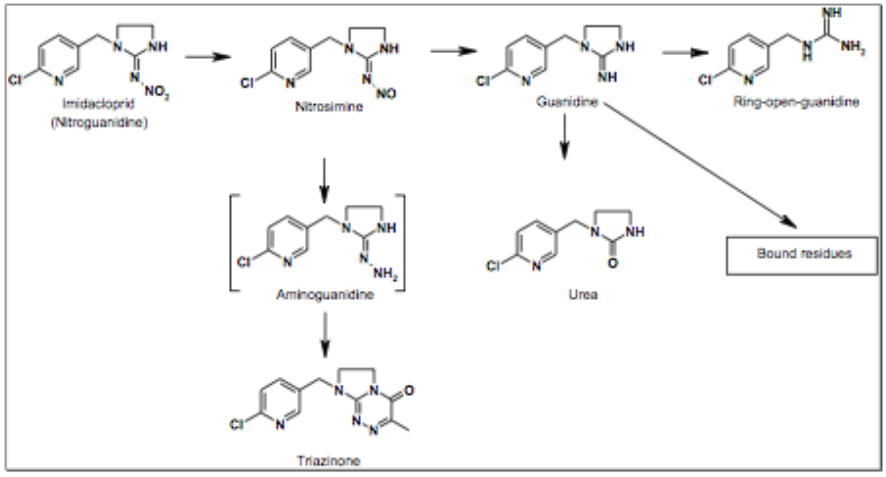


Figure 2. Metabolism of imidacloprid (II): nitro-group reduction to nitrosimine and further loss of NO to form guanidine.

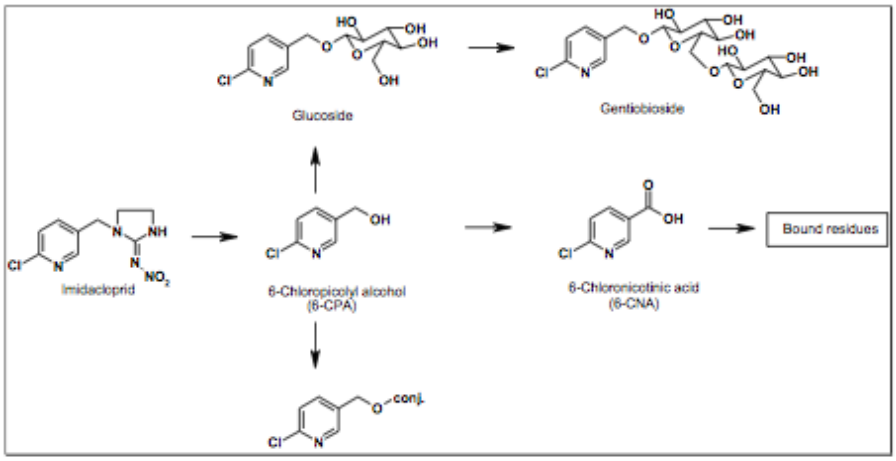


Figure 3. Metabolism of imidacloprid (III): Oxidative cleavage of the methylene bridge to form 6-chloropicolyl alcohol and subsequent oxidation to 6-chloronicotinic acid.

2.1. Devenir dans les sols

Selon le dossier européen, la DT_{50} de l'imidaclopride varie de 187 à 343 jours selon le type de sol et la température (source : CPR p. 77). Le plateau d'accumulation, calculé sur base de la plus longue DT_{50} enregistrée dans les études d'a

accumulation (DT_{50} = 1333 jours) est de 0,463 mg/kg. Footprint (2012) donne 187 jours de DT_{50} au laboratoire, 191 jours de DT_{50} typique, 174 jours de DT_{50} au champ, et 717 jours de DT_{90} au champ.

Une étude française (Bonmatin *et al.* 2005b) a analysé, avec une LOD et une LOQ très basses (0,1 et 1 ppb respectivement) la teneur en imidaclopride de 74 échantillons de sol. 7 d'entre eux, provenant de cultures biologiques ont servi de témoin ; ils n'ont montré aucune contamination. Sur les 67 échantillons restant, 62 contenaient de l'imidaclopride à un niveau détectable et 44 à un niveau quantifiable. Parmi ces échantillons,

- 10 sols étaient traités l'année de l'échantillonnage ; 9 contenaient de l'imidaclopride (2 à 22 ppb, moyenne : 12ppb)
- 33 échantillons provenaient de sols traité un ou deux ans avant l'échantillonnage, 32 étaient contaminés (1,2 à 22 ppb moyenne 6 ppb)
- 11 sols étaient non traités pendant les deux années précédent l'échantillonnage ; 7 contenaient entre 0,1 et 1 ppb, 1 contenait 1,5 ppb d'imidaclopride.

La présence de l'imidaclopride dans les cultures suivantes était confirmée dans le dossier d'autorisation en produit phytophramaceutique par les études en milieu confiné mais pas par les études en champ (CPR p. 21) ; ce dossier considère donc *qu'aucun résidu significatif dans les cultures suivantes ne doit être attendu* (CPR p. 22).

Dans une étude australienne, 37 à 40% d'imidaclopride utilisé en termiticide était encore présent dans le sol 24 mois après l'application. Ce taux de dégradation n'est pas affecté par le degré d'humidité du sol (Baskaran *et al.* 1999).

Selon le dossier européen de la molécule en usage phytosanitaire, si dans certaines études d'accumulation le plateau était atteint après trois ans, dans d'autres études il ne l'était toujours pas après six ans. Selon ces dernières études, réalisées au Royaume-Uni, les DT_{50} étaient (selon l'essai) de 586 et 554 jours. Les experts ont conclu à un *data gap* pour les études d'accumulation (CPR pp. 25-26, 51 et 53).

2.2. Comportement dans l'eau

La molécule-mère est relativement stable dans l'eau et la vitesse de dégradation s'accroît avec la concentration (sur 22 jours, la dégradation va de 0% à 70 $mg.L^{-1}$ à 16% à 105 $mg.L^{-1}$ etc.) (Tisler *et al.* 2009). Avec une DT_{50} de 1,4 à 10 jours, elle y persiste toutefois moins que dans le sol ; la photolyse contribue en effet à sa dégradation CPR p. 30).

L'imidaclopride est fortement hydrophile et on pourrait s'attendre à ce qu'il soit facilement lixiviable, et donc entrainé depuis les sols jusqu'aux eaux de surface et souterraines. Les données de la littérature ne vont pourtant pas toutes en ce sens (Tisler *et al.* 2009) et la CPR considère que le potentiel de lixiviation de la molécule-mère est faible. Une étude indienne (Gupta *et al.* 2002), dans laquelle a été réalisée une lixiviation sur colonne, ne va pas dans le même sens : elle a retrouvé un peu plus du quart de l'imidaclopride mis sur la colonne dans les eaux de lixiviation et c'est dans la partie basse de la colonne que la molécule était la plus présente. Selon cette étude le potentiel de lixiviation des formulations est plus élevé encore que celui de la molécule-mère.

De plus, les eaux de surfaces sont appelées à recevoir des décharges successives de contaminant dans les zones agricoles où la substance est utilisée de façon répétée, avec des effets divers sur les espèces aquatiques, selon la sensibilité de celles-ci à l'exposition

aiguë ou répétée à la substance (Mohr *et al.* 2012). Mohr *et al.*, qui ont étudié l'effet de ces décharges sur un mésocosme, ont utilisé une concentration de 12 µg/L, considérée comme étant dans l'ordre des concentrations effectivement mesurées dans l'environnement.

Un monitoring canadien montre que l'imidaclopride est rarement détecté dans les eaux de surface ; il l'est fréquemment en revanche dans les écoulements provenant de champs traités, avec des concentrations allant de 0,1 μgL^{-1} à 11,9 $\mu g/L^{-1}$ (Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – IMIDACLOPRID, 2007). La DT_{50} est fortement influencée par l'éclairement et varie de quelques jours (photolyse) à 130-160 jours (obscurité).

Une thèse réalisée aux Pays-Bas montre que dans ce pays, la norme MTR (Maximum Tolerance Risk standard = 13 ng/L pour l'imidaclopride) est fréquemment dépassée, surtout dans les deux provinces de Hollande où se font les cultures florales où les doses épandues à l'hectare sont particulièrement importantes (jusque 210g/ha) (Van Dijck 2010).

Un monitoring californien (Starner & Goh 2012) a recherché l'imidaclopride dans les eaux d'écoulement en provenance des terres agricoles. L'imidaclopride est détecté dans 89% des échantillons à de concentrations allant de 0,1 à 3,2 µg/L.

2.3. Métabolisation dans et sur les plantes

Selon une étude faite sur le tournesol issu de semences traitées (Laurent et Rathahao 2003), deux voies majeures de métabolisation existent dans les plantes :

- la réduction suivie de dénitrification qui a pour produit intermédiaire la guanidine et pour produit final l'urée
- l'hydroxydation du cycle imidazolidine (le cycle pentagonal qui porte le groupement azoté) qui a pour résultat la formation d'hydroxy-imidacloprid (2 composés existent, 4 ou 5-hydroxy).

Ces voies de métabolisation dans la plante sont confirmées par Sur et Stork qui en ajoutent une troisième :

- la rupture entre les deux cycles par oxydation, avec pour produits finaux l'acide 6-chloronicotinique (M14) et un radical chloropicolyl conjugué (Sur & Stork 2003).

L'acide 6-CN est également le métabolite final retrouvé, à côté de la molécule-mère, dans une étude italienne portant sur la contamination environnementale par les poussières de semis (Greatti *et al.* 2006). Cette étude a montré que, en suite d'un semis de maïs dont les semences étaient traitées Gaucho®, des résidus (imidaclopride et acide 6-CN) étaient présents sur la végétation environnante (plantes herbacées et fleurs).

Les voies de métabolisation sont les mêmes, que l'imidaclopride soit appliqué en pulvérisation ou en traitement de semences ; toutefois dans ce dernier cas la métabolisation serait plus complète, certains métabolites se trouvant en quantités équivalentes à la molécule-mère (CPR p. 20).

Une étude portant sur la dissipation après application sur le thé montre que celle-ci est rapide (entre 1 et 2 jours) sous le climat considéré (températures de 19 à 30°C) ; le contaminant est détecté dans le thé si les feuilles sont récoltées très vite après la récolte, aussi l'étude conclut-elle à la recommandation d'un délai de 7 jours entre le dernier traitement et la récolte (Gupta *et al.* 2008).

2.4. Dans l'air

L'imidaclopride est peu volatil vu sa faible pression de vapeur (4×10^{-10} Pa à 20°C) (CPR p. 33). S'agissant de l'air, la contamination se confond donc pour l'essentiel avec celle issue

des particules fines produites notamment lors du semis par l'abrasion, dans le semoir pneumatique, de l'enrobement des semences traitées (voir point 4 .2. ci-dessous).

3. Systémicité

L'imidaclopride est une substance hydrophile et hautement systémique : appliquée en traitement de semences, elle se répand dans la plante, via le xylème principalement, à partir de l'enrobage de la graine lors de la germination. Globalement, au fur et à mesure de la croissance de la plante, la concentration tissulaire de la substance va diminuant ; elle se relève toutefois lors de la formation de l'inflorescence, comme on le verra ci-dessous. La substance est également présente dans les fruits de plantes traitées via l'eau d'irrigation (Juraske *et al.* 2009).

La systémicité a ait l'objet d'études spécifiques sur certaines cultures vu les soupçons qui ont pesé et pèsent encore sur la molécule en matière de risque pour les abeilles ; en particulier la présence de la molécule et de ses métabolites a été recherchée dans les matrices apicoles, comme on le verra au point 4 ci-dessous.

3.1. Cas du maïs

Dans le maïs, environ 20% de la substance appliquée sur la semence est absorbée par la plante ; seul un faible pourcentage de celle-ci se retrouve au niveau des organes reproducteurs (Sur & Stork 2003). La concentration moyenne dans la plante est de 4,1 ppb ; elle varie de moins de 1 ppb à plus de 10 ppb ; la concentration dans l'inflorescence est relativement plus importante (6 ppb) (Bonmatin et al. 2005a).

3.2. Cas du tournesol

Une étude par radiomarquage faite dans le tournesol montre que la quantité d'imidaclopride reprise par la plante à partir de la graine est faible (3 à 10%) et décroît des cotylédons vers l'apex. Toutefois la concentration tissulaire s'accroît lorsque l'inflorescence se forme. Cette même étude montre que les métabolites majeurs à tous les stades de croissance de la plante sont les hydroxy- et l'oléfine (Laurent & Rathahao 2003).

Bonmatin *et al.* ont montré que lors de la formation de l'inflorescence de tournesol, la concentration en imidaclopride dans le capitule en formation reprend une courbe croissante. L'imidaclopride se trouve donc en concentrations quantifiables (2,5 à 9 ppb ; moyenne : 8 ppb) dans les capitules de fleurs issues de graines traitées (Bonmatin *et al.* 2005b). Si l'imidaclopride est principalement transporté par le xylème, ce n'est pas forcément le cas de ses résidus et l'acide 6-chloronicotinique par exemple tend à s'accumuler dans le phloème (Sur & Stork 2003).

4. Voies d'exposition de l'abeille

L'exposition de l'abeille à l'imidaclopride est susceptible de se faire par plusieurs voies différentes :

- par contact lorsque le produit est pulvérisé (dérive, application sur un support fréquenté par l'abeille…) ou encore (usage phytopharmaceutique seulement) via les poussières de semis émises par le semoir pneumatique lorsque les semences sont traitées;
- par ingestion lorsque, suite à la contamination de fleurs mellifères, le nectar et le pollen sont contaminés :
- par ingestion d'eau contaminée, ce qui peut se produire par la contamination d'eau stagnantes, par les éluvions en provenance de surfaces traitées, ou encore (usage phytopharmaceutique seulement) par les eaux d'exsudation provenant de plantes

issues de semences traitées, lorsque les circonstances météorologiques font des gouttes d'exsudation la source d'eau la plus facilement disponible pour l'insecte.

4.1. Contamination *via* les matrices apicoles

L'imidaclopride et ses résidus sont détectés dans les matrices apicoles (abeilles, cire, pollen, nectar, eau) dans de nombreuses études. Cette présence est liée à la systémicité de la molécule puisque celle-ci a pour conséquence la contamination du nectar et du pollen ; mais on se souviendra que les matrices apicoles, le pollen notamment, peuvent être contaminées même lorsque le contaminant est appliqué en pulvérisation (Villa *et al.* 2000 ; Smodis-Skerl *et al.* 2009).

La contamination du pollen et du nectar revêtent une importance particulière car elle a pour conséquence l'exposition des abeilles vivant à l'intérieur de la ruche, c'est à dire de toutes les catégories d'abeilles (mâles, ouvrières, reine ; larves, nourrices, magasinières etc.) (Bonmatin et al. 2005a).

4.1.1. Cas du maïs

Dans une étude en champ menée entre 2000 et 2003 sur le maïs traité Gaucho®, Bonmatin *et al.* ont détecté l'imidaclopride dans 87% des échantillons de pollen prélevé sur les inflorescences ; la concentration moyenne est de 2,1 ppb, avec une forte variance (de 0 à 18 ppb). La substance est détectée dans 55% des échantillons de pollen prélevé à la trappe, avec une concentration moyenne de 6 ppb. La différence de concentration entre pollen d'inflorescence et pollen de trappe s'explique par le fait que les pelotes ramenées par les abeilles (trappe) sont constituées d'un mélange de pollens d'origines différentes ce qui n'est évidemment pas le cas du pollen prélevé directement sur l'inflorescence (Bonmatin *et al.* 2005a). Les données de cette étude suggèrent qu'il n'y a pas d'accumulation particulière de l'imidaclopride dans le maïs lorsque les champs sont traités pendant plusieurs années consécutives par un produit contenant l'imidaclopride.

4.1.2. Cas du tournesol

Bonmatin *et al.* ont mesuré la concentration en imidaclopride dans 64 échantillons de pollen de tournesol (Bonmatin et al. 2005b):

- un lot provenant de cultures bio, où aucune trace de la substance n'a été trouvées ;
- un lot de 29 échantillons provenant de champ traités l'année précédent la culture ; dans 2 de ces échantillons l'imidaclopride est détecté en doses non quantifiables (< 1 ppb)
- un lot de 24 échantillons provenant de tournesols issus de graines traitées. l'imidaclopride n'est pas détecté dans 4 de ces échantillons ; dans 6 des échantillons la concentration est intermédiaire entre la LOD et la LOQ ; dans les 14 échantillons restants, la concentration varie entre 1 et 11 ppb.

Ces chiffres sont concordants avec ceux de Sur & Stork qui par radiomarquage retrouvent 1,9 à 3,9 ppb de la substance active dans le nectar et le pollen de tournesols issus de semences traitées (Sur & Stork 2003). Par ailleurs, les capitules de tournesols non traités, cultivés sur un sol traité à l'imidaclopride l'année précédent le semis, contiennent encore des niveaux quantifiables d'imidaclopride (1 – 2 ppb), et la substance reste détectable dans les capitules issus de fleurs plantées sur un sol traité deux années auparavant (Bonmatin *et al.* 2005b).

Ces derniers font remarquer que le pollen contaminé est susceptible d'être emmagasiné dans la ruche et donc de contaminer ses habitantes par vie orale.

Laurent et Rathahao ont trouvé une concentration en résidus totaux, dans le pollen, de 13 ppb en moyenne mais avec d'importantes variations (la déviation-standard est de 13, elle

aussi). On relèvera toutefois que cette étude a utilisé des graines de tournesol enrobées par 1 mg d'imidaclopride/semence alors que la dose recommandée est plus faible (0,7 mg/semence) (Laurent & Rathahao 2003).

Utilisant des semences de tournesol traitées à cette dose, Schmuck *et al.* trouvent des moyennes de 1,9 ppb dans le nectar et 3,3 ppb dans le pollen ; il s'agit d'imidaclopride exclusivement et aucun métabolite n'est détecté à l'analyse (Schmuck *et al.* 2001). Selon cette étude il est impossible que de telles concentrations portent atteinte à l'abeille vu les concentrations létales toxiques (142 ppb par voie orale); toutefois les auteurs ne considèrent que la mortalité par exposition aiguë, et de surcroît calculent leurs concentrations sur base de l'ingestion de 20 μL de sirop contaminé, alors que l'abeille au champ consomme au moins 5 fois, et parfois 12 fois cette dose (Rortais *et al.* 2005), de sorte que le même dosage du contaminant est atteint avec des concentrations 5 à 12 fois moindres, ce qui ramène à des concentrations pertinentes sur le plan environnemental.

4.1.3. La méta-analyse de J. Cresswell

Dans le cadre de sa méta-analyse des effets de l'imidaclopride sur les abeilles, Cresswell estime les doses de cette substance

- dans le nectar de tournesol, à 0,13 ng (dose aiguë, ingérée par l'abeille avec une charge unique de nectar estimée à 40 mg) et 4,4 μg/L (concentration à laquelle l'abeille est exposée de façon chronique, en continu);
- dans le nectar de colza, à 0,023 – 0,03 ng (dose aiguë, même remarque) et 0,7 – 1,3 mg/L (exposition chronique) (Cresswell 2010).

Le nectar du jabot d'abeilles ayant butiné sur phacélie traitée contient 3 à 10 ppb d'imidaclopride (Wallner *et al.* 1999 *in* Decourtye *et al.* 2003 et Bortolotti *et al.* 2003), le pollen en contient moins de 3 ppb (*ibid.*).

4.1.4. Le monitoring français

Une large étude de monitoring a été menée en France entre 2002 et 2005 sur 120 colonies (5 colonies prises au hasard dans 5 ruchers de chacune de 5 régions de France (Eure, Yonne, Indre, Gers et Gard = 125 ruches desquelles il faut décompter les 5 ruches d'un rucher qui a fait défection) ; des échantillons d'abeilles, de cire, de pollen et de nectar ont été prélevés dans chacune de ces ruches et ont fait l'objet d'analyses chimiques pour la recherche de 44 pesticides différents. L'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique arrivent en tête pour ce qui est de la fréquence de détection dans les abeilles (11,2 et 18,7% des échantillons, contenu moyen 1,2 et 1 ppb respectivement), dans le pollen (40,5 et 33% de échantillons, contenu moyen 0,9 et 1,2 ppb) et dans le miel (21,8 et 17,6% des échantillons, contenu moyen 0,7 et 1,2 ppb) ; ce n'est que dans la cire que ces composés ne sont pas détectés, ce que l'on pouvait attendre vu le caractère hautement hydrophile de la substance (la cire est un lipide) (Chauzat *et al.* 2011).

Par contre une étude américaine met en évidence la contamination d'un échantillon de cire, à hauteur de 45 ppb (Wu *et al.* 2012).

4.1.5. Comparaison du niveau de contamination selon les modes d'application

Lorsque l'imidaclopride est appliqué dans l'eau d'arrosage ou par trempage des racines avant repiquage, les concentrations relevées dans le nectar et le pollen sont beaucoup plus élevées que celles rencontrées jusqu'à présent. Dively & Kamel ont analysé le pollen et le nectar de potirons auxquels ont été appliqués en utilisant 9 types de traitements différents : traitement de la semence, trempage des racines lors du repiquage, application via l'eau d'irrigation et méthodes mixtes. Si le mouillage de la terre avant repiquage donne des résultats relativement comparables à ceux observés avec le traitement des semences (6,7 ppb comme maximum), les applications ultérieures au repiquage entrainent

des concentrations très élevées (par exemple des moyennes de 36,7, 69,9 ou 80,2 ppb dans le pollen, selon la méthode testée, pour l'année 2009). Les résidus sont présents également, notamment l'oléfine et les hydroxy- , toxiques, pour l'abeille (35,6 et 52,3% des résidus totaux, respectivement). L'étude montre encore que la concentration en imidaclopride est plus forte dans le pollen que dans le nectar, et dépend fortement de l'année car elle est liée aux conditions météorologiques (Dively GP & Kamel A 2012).

On relèvera enfin que l'étude Dively & Kamel a détecté les néonicotinoïdes recherchés dans 38% des échantillons de nectar et de pollen des plots de contrôle, ce qui confirme la large contamination environnementale déjà vue en France avec l'étude Chauzat *et al.* 2011.

Les concentrations ci-dessus sont à comparer aux doses létales pour apprécier la toxicité des matrices contaminées. Si l'on postule qu'une butineuse consomme couramment 100 mg de nectar par jour (la consommation maximale d'une butineuse est estimée à 128 mg de sucre par jours de 10 heures de vol, soit 320 mg de nectar à 40%, pour rappel), La concentration en nectar doit être de 50 ppb pour que l'abeille atteigne la dose létale 50 par exposition aiguë. Le pollen devrait être encore bien plus concentré (77 ppb) car l'abeille qui en consomme le plus, à savoir la nourrice, a une consommation estimée à 65 mg par jour (Rortais *et al.* 2005). Les concentrations rencontrées au champ ne sont donc pas létales par exposition aiguë ce qui est confirmé par l'expérience (Bailey *et al.* 2005).

4.2. Contamination *via* les poussières de semis

Comme nous l'avons vu précédemment (point 1.2.1. de l'introduction), d'importants problèmes d'intoxication d'abeilles se sont produits concomitamment aux semis de maïs en Allemagne et en Italie (2008), ainsi qu'en Slovénie (de 2008 à 2011 sauf erreur). Les analyses d'abeilles et de matrices apicoles qui ont été faites par les instituts de recherche publics n'ont laissé aucun doute sur le fait que les semences traitées étaient bien à l'origine de la contamination, car les substances insecticides utilisées dans ce type de traitement, - principalement les néonicotinoïdes – ont été retrouvés en quantités importantes (Bortolotti *et al.* 2009 ; Forster 2009). Ces problèmes ont conduit scientifiques et techniciens à s'interroger sur les voies par lesquelles la contamination s'est effectuée et sur les moyens à mettre en œuvre pour en réduire les risques pour les abeilles.

Il est apparu très vite que la contamination était liée aux poussières d'abrasion produites dans les semoirs pneumatiques. Une étude réalisée en Italie a montré qu'effectivement les plantes situées dans les environs des semis étaient sévèrement contaminées (22,4 à 12273,7 ppb : Greatti *et al.* 2006). Cette étude ne donne pas de chiffres de concentrations en contaminants pour le nectar et le pollen, de sorte qu'elle ne permet pas de conclure quant au fait que les niveaux de toxicité létale aient été atteints ou non.

Des essais ont eu lieu pour baisser la contamination par les machines ; deux moyens ont été testés à cette fin :

- l'amélioration de la qualité de l'enrobage
- la pose de déflecteurs sur les semoirs (ces déflecteurs envoient l'air qui charrie les poussières contaminées vers le sol).

Les résultats sont divergents suivant les sources.

Une vaste étude menée par Bayer CropScience montre que ces deux moyens réduisent chacun efficacement l'émission de poussières (Nikolakis *et al.* 2009). Toutefois, des études faites à l'université de Padoue concluent différemment (Marzaro *et al.* 2011, Girolami *et al.* 2011, Tapparo *et al.* 2012, Girolami *et al.* 2012). Ces dernières ont consisté en l'exposition contrôlée d'abeilles aux poussières de semis réalisés à l'aide de machines munies ou non de déflecteurs, et de lots de semences avec enrobage 'ordinaire' ou 'amélioré'. Plusieurs types d'essais ont eu lieu, soit (1) en faisant voler les abeilles au-

dessus du champ objet du semis, soit (2) en les plaçant dans des cages situées à proximité de l'aire de semis, soit encore (3) en les plaçant dans des cagettes suspendues à une tige métallique, ensemble que des opérateurs font circuler dans le nuage de poussières de semis. Ces études montrent :

- que les abeilles sont largement exposées par contact aux poussière de semis car ces poussières sont grosso-modo de même calibre que les grains de pollen; de ce fait tout pollen qu'elles ramèneront à la ruche en suite de l'exposition sera lui aussi largement contaminé puisque l'abeille brossera les particules en même temps que les grains de pollen pour constituer les pelotes qu'elle ramènera à la ruche. En conséquence le niveau de contamination des abeilles exposées est considérable (selon la distance et la localisation par rapport à la sortie d'air, la contamination est de l'ordre de la dizaine de ng au millier de ng/abeille)
- que la toxicité de contact qui découle des poussières ramassées par l'abeille est très fortement potentialisée par le taux d'humidité de l'air dans lequel l'abeille est placée en suite de l'exposition
- que ni les déflecteurs ni les modifications apportées à l'enrobage ne modifient de façon significative les taux de mortalité d'abeilles ayant été exposées au nuage d'évacuation du semoir.

La voie de contamination ainsi mise en évidence explique les incidents survenus dans le contexte du semis de maïs enrobé. Il n'est toutefois pas évident qu'elle soit la seule qu'il faille prendre en considération car il n'est pas établi que la contamination des plantes situées aux abords du semis, telle que mise en évidence par Greatti *et al.*, ne soit pas létale par exposition continue.

4.3. Contamination par l'eau

Vu la contamination large des eaux d'écoulement d'origine agricole (point 2.2. ci-dessus), la contamination des eaux collectées est à considérer comme une voie d'exposition potentielle significative de l'abeille.

Toutefois, il n'existe pas à notre connaissance, d'étude relative à la contamination effective de l'abeille par les eaux de flaques ou de ruissellement. En revanche, la contamination par les eaux d'exsudation a fait l'objet de plusieurs études.

4.3.1. Les fluides d'exsudation

Dans certaines conditions météorologiques les plantes forment des gouttelettes d'exsudation au niveau de la bordure des feuilles sous l'effet de la pression racinaire. Ces gouttelettes sont une source d'abreuvement possible pour les abeilles et pour de nombreux autres insectes.

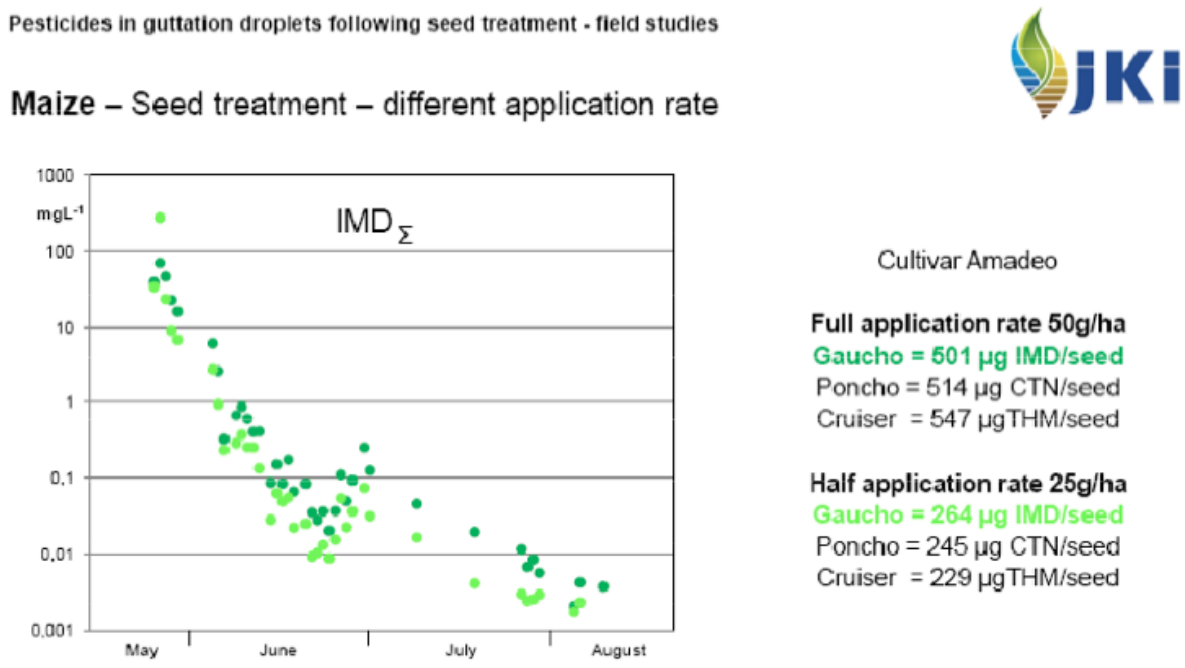
La haute systémicité de l'imidaclopride et sa solubilité dans l'eau ont pour conséquence que la substance active est présente en concentrations élevées dans les fluides d'exsudation. L'exsudation est un phénomène qui se produit dans certaines circonstances où interviennent les conditions météorologiques et l'état de la plante, c'est à dire en gros, lorsque la pression racinaire est élevée, alors que la possibilité de transpiration est faible. Dans ces circonstances, l'eau excédentaire est expulsée de la plante via des hydathodes situés aux marges des feuilles. Il se fait que c'est aussi en bordure des feuilles que les substances systémiques tendent à s'accumuler (Stein-Döneke *et al.* 1992). En conséquence, les niveaux de contamination dans les eaux d'exsudation, qui sont par ailleurs assez variables en fonction de la plante considérée et de son âge, peuvent être extrêmement élevés.

Girolami *et al.* ont récolté et analysé les gouttes d'exsudation émises par des plants de maïs traité. Ils ont montré ainsi que toutes les gouttelettes étaient contaminées à hauteur

de 10 ppm au moins, et jusqu'à 200 ppm en ce qui concerne l'imidaclopride. Les moyennes de concentration sont, pour les différents néonicotinoïdes : pour l'imidaclopride : 47 ± 9.96 mg/litre ; pour la clothianidine : 23.3 ± 4.2 mg/litre ; et pour le thiamethoxam 11.9 ± 3.32 mg/litre (Girolami *et al*. 2009). En offrant à boire ces gouttelettes à des abeilles ils en ont confirmé le caractère toxique et létal.

Hoffmann et Castle ont quantifié de 1 à 37 ppm dans les gouttes d'exsudation provenant de champs de melons cantaloup en Arizona. Pour comparaison, une charge d'eau de 40 mg contenant 1 ppm d'imidaclopride correspond à une dose de 40 ng par abeille, ce qui est de loin supérieur à la DL_{50} établie. Cette DL_{50} peut être très variable on l'a vu, et pour certains groupes d'abeilles elle atteint 80 ng/abeille ; mais même si l'on se place dans un tel cas, le contenu en toxique de deux charges d'eau suffirait néanmoins à tuer l'abeille (Hoffmann & Castle 2012).

La contamination des eaux d'exsudation est maximum au début de la croissance de la plante et décroît au fur et à mesure de celle-ci. Une étude réalisée en Allemagne montre que deux mois après le semis, la concentration est encore de l'ordre de la dizaine de μgL^{-1} (Schenke *et al*. 2011 *in* EFSA PPR 2012). Dans cette étude le produit (Gaucho®) a été appliqué au taux prescrit (50 g/ha) et à la moitié de celui-ci (25 g/ha) ; la concentration en imidaclopride varie peu selon ces deux taux d'application.



Le danger des eaux d'exsudation pour les abeilles reste actuellement sujet à controverse. Il s'agit en effet de phénomènes ponctuels, déterminés par des conditions spécifiques ; ils ne s'en produisent pas moins tous les ans. L'inconnue principale à ce jour réside dans la fréquence avec laquelle les abeilles ont recours à cette source et des études devraient être conduites aux fins d'éclaircir ce point (Reetz *et al*. 2011). Néanmoins, cette coïncidence existe parfois, et le fait que les abeilles puissent s'approvisionner à cette source est certain (H. Riebe, communication orale, cf. photo ci-contre)

5. Toxicité pour les abeilles

Avec une DL_{50} aiguë d'environ 5ng/abeille, l'imidaclopride est l'un des composés les plus toxiques qui soient pour cet insecte. Par comparaison, la DL_{50} du diméthoate, qui est le toxique standard usuel des tests de toxicité sur abeilles, est de 152 ng/abeille. Contrairement à de nombreux autres insecticides, l'imidaclopride est plus toxique par voie orale que par contact (Suchail *et al*. 2000).

L'imidaclopride, on l'a vu, a une très grande affinité pour les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. Il n'agit toutefois pas identiquement sur tous les neurones ; il est un agoniste complet de l'ACh dans certains d'entre eux, et un agoniste partiel dans d'autres ; il y aurait donc deux populations de récepteurs (Schmuck *et al*. 2003). Pour d'autres auteurs (Lambin *et al*. 2001), les deux populations neuronales expliqueraient les effets tantôt agonistes, tantôt antagonistes de l'imidaclopride, qui pourraient exister chez l'abeille et expliquer certaines particularités toxicologiques (voir point 5.6. ci-dessous).

La toxicité de l'imidaclopride pour les insectes tient à la molécule-mère mais aussi aux métabolites qui se forment dans la plante et l'animal, notamment l'oléfine et le 5-hydroxy-imidaclopride. Le mécanisme que la toxicité de l'imidaclopride met en jeu est complexe, et en partie différé via la toxicité de ses métabolites.

En outre, plusieurs paramètres sont susceptibles d'influer sur les propriétés toxiques de contaminants tels les biocides ou les substances phytosanitaires. Ainsi, les effets sublétaux varient en fonction de l'âge de l'abeille, dont les deux types de récepteurs nicotiniques, dotés d'affinités différentes pour les nicotinoïdes, s'exprimeraient différemment selon l'âge (revu par Belzunces *et al*. 2012). La toxicité des substances dépend également de l'état sanitaire des abeilles ; l'infection par Nosema par exemple, a pour effet que des doses non létales chez l'abeille saine, ont un effet létal chez les abeilles infectées (Vidau *et al*. 2011 ; cette étude a porté sur deux molécules dont un néonicotinoïde : le thiaclopride).

Enfin, la toxicité des molécules varie également avec les conditions auxquelles l'abeille est soumise. Une équipe italienne (CRA-Api) a montré que la toxicité d'une substance pour l'abeille varie avec la température, y compris à l'intérieur de la zone de tolérance donnée par les lignes-guides, selon lesquelles les essais visant à établir les doses létales 50 doivent se faire à 25°C ± 2°C. Ces 4 degrés de tolérance peuvent entraîner des différences significatives entre les doses létales mesurées : les chercheurs ont ainsi noté que l'augmentation de la température fait diminuer la DL_{50} du fipronil; au contraire, la DL_{50} du thiamethoxam augmente en fonction de la température, avec le risque de sous-estimer sa toxicité si l'essai est fait à la température la plus basse autorisée par la ligne-guide (Medrzycki *et al*. non publié, exposé à l'ICPBR, Wageningen, 2 novembre 2011).

Le problème est donc complexe, une complexité que reflète la variabilité des résultats des études relatives aux effets de l'imidaclopride sur l'abeille. Cette variabilité pose problème, notamment quant à la fiabilité des études en champ. La méta-analyse conduite par J. Cresswell sur 14 études montre que si l'imidaclopride n'a pas d'effets létaux aux concentrations du champ, il réduit le degré de performance des abeilles par effets sublétaux (Cresswell 2010). Toutefois, la méta-analyse montre surtout que font largement défaut les connaissances qui permettraient de prédire avec un minimum de fiabilité les effets qu'a l'imidaclopride sur l'abeille dans les conditions du champ. En effet, les tests en champ ont une puissance statistique à ce point limité qu'ils ne sont guère aptes à déceler les problèmes éventuels. La méta-analyse prend en compte quatre de ses études; la probabilité que, toutes ensembles, elles soient passées à côté des effets sublétaux prédits par ailleurs en laboratoire, est de 36% ; un résultat qui, selon l'auteur, *est inacceptablement élevé pour conclure que de tels effets sublétaux sont inexistants*. D'autres facteurs d'incertitude s'ajoutent à ce problème. Manquent en effet, poursuit l'auteur, la connaissance (1) du lien entre un effet montré en laboratoire et les dommages

éventuels au niveau de la colonie et (2) de la toxicité pour d'autres catégories d'abeilles que les ouvrières adultes usuellement utilisées pour les tests ; enfin, (3) dans la réalité les néonicotinoïdes sont dilués dans les réserves alimentaires de l'abeille, avec des effets eux aussi dilués, mais (4) l'imidaclopride peut s'ajouter à d'autres facteurs de stress, comme la maladie, la pauvreté de la ressource alimentaire ou la présence d'autre contaminants. Nous ajouterons à ces constats que d'intéressantes études montrant des effets sublétaux par exposition aiguë (Henry *et al.* 2012, Eiri *et al.* 2012) gagneraient à être reproduites en exposant l'abeille à des doses répétées ou en continu ; toutefois, la mise au point des protocoles nécessaires reste à faire.

La question des effets exacts des faibles doses sur le devenir des colonies n'est donc pas entièrement résolue à ce jour, d'autant plus que l'évaluation que la molécule a subie dans le cadre de son autorisation comme substance active phytosanitaire a été réalisée suivant un schéma qui ne permet pas la prise en compte adéquate des effets éventuels de substances présentes dans le nectar et le pollen (Alix & Vergnet 2007). Mais d'ores et déjà l'imidaclopride, par ses nombreuses particularités toxicologiques a bouleversé les notions existantes de toxicologie de l'abeille (et d'autres !), comme nous le verrons ci-dessous.

5.1. Répulsivité – influence de la substance sur la consommation

La consommation de sirop contaminé par les abeilles chute dès que la concentration atteint 0,5 ppm (Bortolotti *et al.* 2003) à 1 ppm (Nauen *et al.* 2001b) ; à ces concentrations les abeilles cessent graduellement de fréquenter le nourrisseur (Bortolotti *et al.* 2003), ce qui peut être du à un effet répulsif de la substance ou au fait que, à partir de certaines concentrations, l'imidaclopride induit chez l'abeille une immobilité qui entrave le nourrissement (Nauen *et al.* 2001b) (pour les effets sur la mobilité voir le point 5.5.3. ci-dessous). Cette concentration est bien supérieure à celle à laquelle l'abeille est exposée au champ, qui est de l'ordre du ppb. Decourtye *et al.* n'ont observé aucun effet répulsif de l'imidaclopride au cours de leurs tests, où la concentration maximale utilisée était de 96 ppb ; en revanche la consommation de sirop était significativement plus faible chez les abeilles traitées au 5-hydroxy-imidaclopride, dès 30 ppb, chez les abeilles d'hiver (Decourtye *et al.* 2003).

L'effet répulsif de la substance varierait en outre avec l'âge de l'abeille (Schmuck 1999 *in* Nauen *et al.* 2001b).

5.2. Toxicité létale par exposition aiguë

5.2.1. Toxicité aiguë de la molécule-mère

La DL_{50} par exposition orale aiguë de l'imidaclopride pour l'abeille montre une grande variabilité, (facteur 20 : de 3,7 (Schmuck *et al.* 2001) à 102 ng/abeille (Nauen *et al.* 2001b), suivant le test). Les abeilles étant regroupées par 10 ou 20 en cagettes, et recevant une dose unique par cagette qu'elles se répartissent ensuite entre elles, l'hypothèse a été émise que cette variabilité serait liée à l'inégalité de la répartition. Mais cette variabilité persiste quand les abeilles sont nourries individuellement ; elle serait due à des facteurs inhérents à l'abeille comme l'âge, la sous-espèce ou la colonie (revu par Decourtye & Devillers 2010) ; toutefois, d'une étude impliquant 7 laboratoires différents, il n'apparaît pas de différence significative en fonction du rucher (Schmuck *et al.* 2003).

Visser & Blacquière ont comparé la mortalité dans les conditions du laboratoire ou du champ en exposant des abeilles à 5 concentrations variant de 0 à 70 ng/abeille (dose unique) ; la moitié des abeilles de chaque traitement est restée en laboratoire tandis que l'autre moitié a été remise au champ. Une surmortalité significative est apparue à la dose de 70 ng, mais au champ seulement. Il est à noter que la faible puissance statistique du test (10 abeilles par groupe) ne permettait pas de discriminer des variations fines entre traitements (Visser & Blacquière 2010).

La DL_{50} par contact de l'imidaclopride est de 81 ng/abeille ; mais certaines formulations sont plus toxiques (SC200 : 58 ng/ab, SL200 : 42 ng/ab …) (DAR point B.9.4.1.2). Ici aussi la variabilité des résultats est très importante.

Enfin et surtout, la toxicité de l'imidaclopride pour l'abeille présente d'importantes particularités :

- la mortalité connaît un premier pic à des doses basses (vers les 5 ng/abeille), puis décroît avec la dose, et remonte ensuite pour former un second pic (Suchail *et al.* 2000 ; Suchail *et al.* 2001) : la courbe dose-réponse montre donc deux pics, ce qui est inhabituel.
- la mortalité par intoxication orale apparaît plus rapidement à faible dose et plus tardivement aux doses les plus élevées (Suchail *et al.* 2000). De même certaines mortalités n'apparaissent que 24 heures après exposition topique (Nauen *et al.* 2001b).
- les mortalités n'apparaissent que 4 heures après l'intoxication et se prolongent pendant plus de 96 heures (Suchail *et al.* 2003) (ce qui pose question quant à la pertinence du tests d'établissement de la DL_{50} pour ce composé, ces tests ne prévoyant l'enregistrement des mortalités que pendant 48 h).

5.2.2. Toxicité aiguë des métabolites.

L'imidaclopride est rapidement métabolisé dans l'abeille : sa demi-vie dans l'abeille est de 4-5 heures, et il n'est plus détecté après 24 heures. L'oléfine et le 5-hydroxy-imidaclopride apparaissent dans le même temps et sont deux métabolites significatifs (4 heures après exposition ils représentent chacun environ 10-15% du total ingéré) (Suchail *et al.* 2003). Toutefois cette dernière étude n'a recherché que ces deux métabolites. Or 30% environ des résidus ne sont plus détectés 20 minutes après l'administration ; il s'agit vraisemblablement d'autres métabolites, qui donc pourraient avoir une importance significative dans les mécanismes toxiques suivant l'ingestion d'imidaclopride.

Ces effets létaux ne sont vraisemblablement pas dus à l'urée, ni à l'acide 6-chloronicotinique, car dans des essais de déplacements faits sur des préparations de têtes d'abeilles, ces deux métabolites sont incapables de déplacer l'imidaclopride du récepteur auquel il s'est lié, ce qui indique que leur efficacité est de 5 ordres de grandeur au moins inférieure à celle de la molécule-mère. L'oléfine par contre est plus active, et donc logiquement plus toxique pour l'abeille que la molécule-mère. L'échelle de toxicité est comme suit : oléfine>imidaclopride>5-hydroxy->4,5-hydroxy- (Nauen *et al.* 2001b, Schmuk *et al.* 2003). Dans des essais faits sur des cellules provenant des lobes antennaires, l'oléfine est deux fois plus active que la molécule-mère (Nauen *et al.* 2001b).

Ces résultats sont concordants avec ceux de Suchail *et al.*, pour qui seuls deux métabolites ont par exposition aiguë une toxicité proche de la molécule-mère, l'oléfine qui est plus toxique que l'imidaclopride et le 5-hydroxy qui l'est moins (Suchail *et al.* 1999).

5.3. Toxicité létale par exposition chronique

La toxicité par exposition chronique peut être plus faible, égale ou plus forte que par exposition aiguë. En clair, lorsque des abeilles sont nourries par du sirop contaminé en continu elles peuvent parfois ingérer quotidiennement, sans subir de mortalité, des doses plus fortes que lorsqu'elles reçoivent tout le contaminant en une fois ; par contre pour d'autres substances la dose létale 50 est bien plus petite lorsque l'exposition est continue que lorsqu'elle n'a lieu qu'une seule fois (Illarionov 1991 – cette publication concerne essentiellement des pyréthrinoïdes). L'exposition chronique peut aussi se faire par doses répétées – une dose de la substance testée dans de 10 ou 20 µL tous les matins, puis nourrissement *ad libitum* au sirop non contaminé. Dans ce cas aussi le rapport entre la

dose létale 50 chronique, ainsi établie, et la dose létale aiguë, est très variable (DEFRA 2007).

Dans ce cas-ci aussi la variabilité des résultats obtenus est très importante ; elle tient vraisemblablement à certains paramètres propres aux abeilles (âge, lignée etc.) La difficulté d'interprétation des résultats apparaît bien dans les tests disponibles à ce jour, tous issus de la littérature scientifique car en matière d'évaluation des molécules phytopharmaceutiques ou biocides, aucun test de ce type n'est prescrit ni, en conséquence, réalisé.

5.3.1. Toxicité létale chronique de la molécule-mère

Schmuck *et al.* n'obtiennent aucune mortalité ni aucune symptôme d'empoisonnement en offrant à des mini-colonies sur 4 cadrons du miel contaminé ou des cadres issus de ruchettes nourries au sirop contaminé (de 2 à 20 ppb). Le développement des colonies reste normal – mais on notera que ce développement est quasiment nul (Schmuck *et al.* 2001). De même Faucon *et al.* ne constatent aucun effet négatif – et en particulier aucune mortalité hivernale - sur les colonies nourries avec 13 fois 1L de sirop à 0,5 ou 5 ppb d'imidaclopride, dans un essai de nourrissement en champ (Faucon *et al.* 2005).

En laboratoire, Suchail *et al.* ont obtenu une mortalité significative à 0,1 ppb (Suchail *et al.* 2001) et >60% à 1 et 10 ppb alors que Decourtye *et al.* n'ont obtenu une mortalité significative, cumulée sur 15 jours (20% de mortalité contre 10% dans le contrôle) qu'à 48 ppb sur abeilles d'hiver (pas de mortalité significative à 24 ppb) et à 96 ppb sur abeilles d'été (Decourtye *et al.* 2003).

5.3.2. Toxicité létale chronique des métabolites

Les différences entre métabolites enregistrées lors des tests d'intoxication aiguë s'estompent dans les tests de mortalité chronique, où tous les métabolites de l'imidaclopride apparaissent toxiques. Suchail *et al.* obtiennent une mortalité similaire et supérieure à 50% pour tous les métabolites quelle que soit la concentration (0,1 ou 1 ou 10 ppb ; 0,1 ppb équivalant à 0,012 ng/abeille) : sont toxiques par exposition chronique selon cette étude, non seulement l'oléfine et le 5-hydroxy – qui ont une toxicité proche de l'imidaclopride par exposition aiguë – mais aussi le 4,5-hydroxy, le desnitro-, l'urée et l'acide 6-chloronicotinique (Suchail *et al.* 2001). En revanche selon (Decourtye *et al.* 2003) le 5-hydroxy-imidaclopride est nettement moins toxique que l'imidaclopride (40% de mortalité cumulée à 240 ppb, pas de mortalité à 120 ppb). On relèvera que dans l'étude (Suchail *et al.* 2001) où la toxicité chronique est particulièrement élevée, la toxicité aiguë n'est pas la plus forte à avoir été mesurée, la DL_{50} mesurée dans cette étude étant de 60 ng/abeille.

Au total, les chiffres obtenus à ce jour en matière de toxicité chronique létale laissent à penser que celle-ci est encore bien plus haute que la toxicité aiguë de la substance, et mériterait des études développées. Les études existantes mériteraient d'être reproduites ; les hypothèses relatives aux paramètres pouvant expliquer les variations enregistrées entre études devraient faire l'objet d'investigations.

5.4. Effets sur les larves

Le temps de développement (jusqu'à l'émergence) de larves d'abeilles nourries avec un sirop contaminé par l'imidaclopride (5ppb) est plus long que le temps de développement des larves de contrôle (Decourtye et al. 2005 *in* Decourtye & Devillers 2010).

Nous n'avons pas connaissance d'autres études relatives à l'effet de l'imidaclopride sur les larves d'abeilles. Lors de l'évaluation de l'imidaclopride comme substance

phytopharmaceutique, il a été considéré que les tests en champ étaient suffisants pour évaluer l'effet sur els larves d'abeilles (CPR p. 42). Ce domaine aussi mériterait d'être investigué.

5.5. Effets sublétaux

Les effets sublétaux sont ceux que l'on observe chez l'insecte après contamination et qui ne sont pas suivis de la mort pendant la période d'observation. Ils n'en sont pas moins susceptibles de provoquer la mort prématurée de l'insecte et/ou de la colonie ; ils peuvent également pétré suivis de la récupération complète des facultés de l'insecte.

Les effets sublétaux peuvent apparaître tant après exposition unique (toxicité aiguë) qu'après exposition répétée ou continue (toxicité chronique).

5.5.1. Symptômes d'intoxication

De façon générale, les abeilles exposées à l'imidaclopride montrent des symptômes d'intoxication nerveuse tels que tremblements ou culbutes, des symptômes qui s'effacent après quelques heures pour faire place à l'hypo-activité et l'hypo-réactivité (Suchail *et al.* 2001 ; Suchail *et al.* 2003 ; Visser & Blacquière 2010). L'effet dit « knockdown »[23] peut également être présent selon (Bortolotti *et al.* 2003 ; Nauen et al. 2001a *in* Decourtye & Devillers 2010), une étude qui évoque également l'immobilité des abeilles après intoxication. Globalement l'intoxication sublétale se traduit donc, à terme, par l'apathie de l'abeille. Toutefois, à de très faibles doses, l'imidaclopride a l'effet inverse : il agit sur l'abeille comme un dynamisant.

Effet dynamisant des faibles doses

Plusieurs études relèvent cet effet. Teeters *et al.* constatent ainsi que l'imidaclopride a un effet stimulant sur l'activité locomotrice à 0,05 ppb, l'effet étant inverse aux doses plus élevées (Teeters *et al.* 2012). Lambin *et al.* constatent le même effet à 0,25ng/abeille (dose qui est grosso-modo concordante avec la concentration de Teeters) ainsi qu'une facilitation de l'habituation (disparition du réflexe d'extension de la langue en l'absence de stimulus sucré) à la dose de 1,25 ng, alors que l'effet inverse est noté aux doses plus élevées testées dans cette étude (2,5 à 20 ng/abeille) (Lambin *et al.* 2001). Colin *et al.* relèvent également que les nuclei qui sont soumis au traitement imidaclopride depuis 1 jour (6 ppb) fréquentent plus assidument le nourrisseur, au contraire de ce qui se passe avec le fipronil. Cette tendance a disparu le 4ème jour, où la fréquentation au nourrisseur contaminé est moindre que dans les contrôles pour 2 nuclei sur 3 (Colin *et al.* 2004).

L'acétamipride, un néonicotinoïde cyanosubstitué, aurait également des effets de ce type. L'exposition orale à 1 µg/abeille accroît la sensibilité au saccharose et l'application topique à 0,1 et 0,5 µg/abeille accroît l'activité locomotrice (El Hassani *et al.* 2007) (NB : ces doses sont très faibles par rapport à la DL_{50} qui est de 8,09 µg/abeille (Footprint 2012)).

5.5.2. Effets sur la longévité

Une étude propose un modèle statistique permettant d'évaluer l'effet d'un contaminant sur la durée de vie (Dechaume-Montcharmont *et al.* 2003). Ce modèle a été appliqué à une expérimentation où des abeilles en cagettes (cagettes Pain, 50 abeilles) ont été élevées en utilisant dès le second jour des sirops contaminés à l'imidaclopride (4 et 8 ppb) et à la deltaméthrine (15 et 30 ppb). L'étude montre un raccourcissement significatif de la durée de vie dans les deux cas. S'agissant de l'imidaclopride, la mortalité s'élève fortement après 30 jours environ, la durée moyenne de vie étant de 28,3 ± 5,6 j à 4 ppb et 31,3 ± 4,1

[23] Il s'agit d'un effet immédiat d'incoordination motrice de l'insecte, qui le rend incapable de voler et de se déplacer. En matière de protection contre les pestes, l'effet knock-down représente la mise hors d'état de nuire immédiate ; il ne signifie toutefois pas la mort de l'insecte.

j à 8 ppb ; le raccourcissement par rapport à la normale est d'une quinzaine de jours environ. La mortalité naturelle est en outre bien plus étalée, atteignant les 50% à 45 jours environ, et montant progressivement jusqu'aux 100% à 60 jours. Une autre étude réalisée avec des abeilles plus âgées ayant montré qu'aux mêmes doses celles-ci mourraient après trois jours d'exposition environ (Suchail *et al.* 2001, voir ci-dessus), les auteurs suggèrent que les abeilles âgées pourraient être beaucoup plus sensibles que les abeilles plus jeunes à l'intoxication. On notera que des changements physiologiques importants surviennent au moment où l'abeille devient butineuse, notamment quant au système immunitaire ; ces changements pourraient expliquer la différence de sensibilité entre abeilles jeunes et butineuses. Les résultats de l'étude Dechaume-Montcharmont 2003 sont d'une importance fondamentale en regard de l'importance de la durée de vie de l'abeille pour la survie de la colonie (voir point 2.2. de la partie relative à l'abeille dans l'introduction à ce rapport). Enfin, on notera qu'entre les deux concentrations testées la relation dose-réponse est inverse, la concentration la plus basse menant aux plus fortes mortalités sur la totalité des courbes mortalité/temps.

Une expérimentation américaine (Lu *et al.* 2012) a montré que des colonies nourries avec du sirop de maïs contaminé par l'imidaclopride menait à la mort des colonies hivernantes par disparition des abeilles, c'est à dire à un syndrome ressemblant au « CCD » (Colony collapse disorder), phénomène qui ravage les ruchers américains et paraît similaire à celui qui ravage les ruchers européens. L'hypothèse de base de l'étude étant que les colonies disparaissent à cause de la contamination du nourrissement, les auteurs ont alimenté les abeilles, pendant la période de nourrissement (9 semaines), avec des sirops dont la concentration en imidaclopride a été calculée sur base des LMR pour le maïs ; ces concentrations sont supérieures à celles rencontrées usuellement dans l'environnement. L'étude n'en montre pas moins que la contamination par l'imidaclopride peut entrainer la mortalité différée de la colonie par disparition d'abeilles exposées dès le stade larvaire ainsi que via les réserves hivernales (et au passage, que les LMR définies sur base d'études réalisées sur des mammifères sont totalement inadaptées aux abeilles).

5.5.3. Effets sur la mobilité

Administré en dose unique, l'imidaclopride à la concentration de 500 ou de 100 ppb modifie le comportement d'abeilles maintenues en cagettes en couveuse: les abeilles traitées restent plus longtemps immobiles, et de façon générale se déplacent moins que les abeilles des boîtes de contrôle. En outre, le comportement social est réduit (elles se meuvent davantage indépendamment l'une de l'autre). Cet effet est toutefois transitoire, et disparaît après quelques heures (Medrzycki *et al.* 2003). Ces concentrations sont nettement plus élevées que celles auxquelles l'abeille est exposée au champ, qui sont de l'ordre du ppb.

Lambin *et al.* ont testé l'effet d'une gamme de doses sublétales sur la locomotion (test en boîtes de 30 cm x 30 cm divisées en carrés de 5 cm de côté). A la dose la plus basse utilisée dans les tests (1,25 ng/abeille), l'imidaclopride accroît la mobilité de l'abeille ; en revanche, la mobilité décroît fortement dès 2,5 ng/abeille, un effet qui s'accentue avec le temps (Lambin *et al.* 2001). Aucune récupération n'était notée après 2 heures.

Teeters *et al.* ont étudié par traçage vidéo l'effet, sur la mobilité de l'abeille, de deux substances, à savoir le τ-fluvalinate (pyréthrinoïde, très présent dans les ruches car c'est un médicament de la varroase) et l'imidaclopride. Les paramètres testés sont la distance parcoure en 24 heures par l'abeille, le temps d'interaction avec un congénère, et le temps passé au nourrisseur. L'imidaclopride a été testé à six concentrations différentes (0,05 à 500 ppb), et le τ-fluvalinate à trois. Aux concentrations les plus hautes l'imidaclopride accroît le temps passé au nourrisseur ; toutefois il diminue ce même temps à la concentration la plus basse (0,05ppb). Il diminue également le temps d'interaction avec les congénères (à 0,5ppb la moyenne est de 84 min ± 23 contre 147 min ± 32 pour le

groupe de contrôle). Le temps passé à l'alimentation augmente dans les groupes exposés aux concentrations les plus élevées (Teeters *et al*. 2012).

De manière générale, il apparaît donc que l'imidaclopride réduit la mobilité (l'abeille devient apathique) sauf aux très faibles doses où la substance a l'effet inverse (effet dynamisant, voir point 5.5.1. ci-dessus).

5.5.4. Effets sur l'orientation et le butinage

Curé *et al*. ont constaté que l'imidaclopride à 100 ppb entrave la communication des sources de nourriture entre abeilles ; toutefois cet effet cesse dès que cesse le traitement et la capacité de butinage de la colonie est restaurée dès que celui-ci prend fin (Curé *et al*. 2001 *in* Bortolotti *et al*. 2003).

Ramirez-Romero *et al*. ont comparé l'intensité de butinage d'abeilles ayant ingéré du sirop contaminé avec de l'imidaclopride (48 ppb), de la deltaméthrine (500 ppb) et de la protéine transgénique Cry 1Ab. L'imidaclopride affecte fortement le butinage, qui diminue sensiblement ; toutefois il y a récupération après le traitement (Ramirez-Romero *et al*. 2005).

Yang *et al*. ont entraîné des abeilles à visiter un nourrisseur situé à 35 m de la ruche. Ils ont remplacé ce nourrisseur par un autre, contenant du sirop contaminé, dans lequel les abeilles ont pu puiser une seule fois, ensuite le nourrisseur non contaminé a été replacé ; il s'agit donc d'une exposition aiguë des abeilles. Une gamme de concentrations a été testée par répétition de ce protocole, allant de 50 à 6000 μg/L (soit environ de 42 ppb à 5 ppm vu la densité du sirop). Le pourcentage d'anomalies dans le butinage croît avec la concentration d'imidaclopride (de 15% à la concentration la plus basse, à 100% dès 1,2 ppm) ; ramenés aux doses, ces chiffres montrent des anomalies pour des doses allant de 1, 82 à 4,33 ng/abeille, selon la quantité de sirop contaminé ingérée. Les abeilles peuvent récupérer et retourner ensuite normalement au nourrisseur pourvu que la concentration n'excède pas 1,6 ppm ; passé ce dosage, une partie des abeilles ne retourne plus au nourrisseur. Les anomalies de butinage apparaissent immédiatement aux plus fortes concentrations, mais à 50 μg/L le délai d'apparition est de 20 min environ ; en fait la longueur de ce délai varie en fonction inverse au dosage. Les abeilles qui ne sont pas revenues au nourrisseur (*missing bees*) ne sont pas rentrées à la ruche, et les auteurs ignorent où elles ont pu aller pendant leur temps de disparition (Yang *et al*. 2008).

Bortolotti *et al*. ont entrainé des abeilles à fréquenter un nourrisseur situé à 500m de la ruche ; le nourrisseur a été traité avec des concentrations en imidaclopride allant de 100 à 1000 ppb. Après traitement les abeilles sont maintenues en cage pendant une heure puis relâchée et peuvent retourner librement à la ruche, puis à nouveau au nourrisseur. A 500 ou 1000 ppb les abeilles disparaissent et ne reviennent plus ni à la ruche ni au nourrisseur ; il est probable quelles se perdent en route. A 100 ppb le nombre d'abeilles revenant au nourrisseur est affecté ; 70% d'entre elles reviennent toutefois à la ruche et reprennent la fréquentation du nourrisseur dans les 24 heures. Elles mettent plus de temps à revenir à la ruche : généralement plus de 5 heures quand les abeilles de contrôle reviennent endéans les 2 heures. L'imidaclopride retarde également l'envol des abeilles, ce qui est cohérent avec l'apathie des abeilles constatée par ailleurs. Les abeilles traitées montrent par ailleurs des signes de désorientation, tombent au sol etc (Bortolotti et al. 2003). Si l'on postule une charge de 40 mg de nectar par abeille, 100 ppb représentent 4 ng d'imidaclopride, NDLR.

Colin *et al*. ont étudié le comportement de butinage en tunnel avec nourrissage par un sirop contaminé à l'imidaclopride à 6 ppb. A cette dose l'imidaclopride ne diminue pas la fréquentation du nourrisseur, mais le nombre d'abeilles inactives au nourrisseur s'accroît avec le temps (l'observation a duré 4 jours après le début du traitement) par rapport au

nombre d'abeilles actives (Colin *et al.* 2004), ce qui est cohérent avec l'étude de Teeters évoquée ci-dessus.

Schneider *et al.* ont étudié le temps consacré par les abeilles aux voyages de butinage sous l'effets d'une contamination par deux néonicotinoïdes, l'imidaclopride et la clothianidine. Les chercheurs ont entraîné des abeilles sous tunnel à fréquenter un nourrisseur, et ont analysé ensuite, grâce aux puces RFID et à des lecteurs placés sur le nourrisseur et à l'entrée de la ruche, le temps moyen passé par des abeilles lors des vols aller et retour, et sur le site même du nourrisseur. Les abeilles ont été exposées à deux néonicotinoïdes, l'imidaclopride (4 dosages de 0,15 à 6 ng/abeille) et la clothianidine (4 dosages de 0,05 à 2 ng/abeille). Les trois-quarts des abeilles ayant reçu 6 ng d'imidaclopride ne sont jamais revenus à la ruche. Ce taux de perte chute avec la dose de ce contaminant, et aucune perte n'est enregistrée aux deux plus faibles doses. Les abeilles traitées à 3 et 6 ng qui ne revenaient pas directement à la ruche montraient des symptômes tels tremblements, phases d'immobilité etc. L'effet est plus sévère avec la clothianidine : un quart des abeilles ne revient plus à la ruche après avoir reçu 1 ng et 80 % ne reviennent plus quand la dose est de 2 ng. Le nombre de visites au nourrisseur chute drastiquement chez les abeilles traitées à l'imidaclopride, et ce dès 1,5 ng (-47% de visites après ingestion de cette dose, 0 visites dans les 24 heures à 6 ng). Avec la clothianidine, la fréquentation chute d'un tiers à 0,5 ng, des trois-quarts quasiment à 1 ng. Les deux contaminants modifient également la durée des voyages et l'intervalle entre ceux-ci; la nature de l'effet varie toutefois selon la substance. Alors que l'imidaclopride allonge la durée de tous les segments du voyage, la clothianidine allonge le temps passé au nourrisseur, mais non le temps de vol vers le nourrisseur. Lorsque la dose est élevée (2 ng) l'effet se prolonge sur 32 heures. Lorsque la dose de clothianidine est faible (0,05ng), l'abeille, le jour suivant, passe moins de temps au nourrisseur et ses vols sont raccourcis d'autant (Schneider *et al.* 2012).

Des effets sur l'aptitude de l'abeille à orientation, à des doses du même ordre que les doses journalières auxquelles l'abeille peut être exposée en champ, sont également perceptibles avec le thiamethoxam (Henry *et al.* 2012).

L'imidaclopride réduit l'aptitude de l'abeille à la danse. Après exposition aiguë à 0,21 ng de la substance par abeille, le nombre des circuits effectués lors de la danse chute drastiquement, ce qui compromet le recrutement et donc la récolte, le développement et l'état sanitaire général de la colonie. Cet effet persiste 24 heures après le traitement (Eiri & Nieh 2012).

Par ailleurs, les néonicotinoïdes sont également susceptibles d'effets sur la capacité de l'abeille à s'orienter dans un labyrinthe ; alors que 61% des abeilles de contrôle trouvent la sortie du labyrinthe sans erreur, seulement 36% des abeilles traitées par le thiaméthoxam à 3 ppb y sont arrivées (Decourtye non publié, dans Decourtye & Devillers 2010).

5.5.5. Effet sur le seuil de perception du sucre

Lambin *et al.* ont testé l'effet d'une gamme de doses d'imidaclopride sur le seuil gustatif de l'abeille (test d'extension du proboscis). Ce seuil s'accroît significativement dès la dose de 5 ng/abeille. Aux doses plus faibles le seuil tend à baisser (accroissement de la sensibilité) mais la différence enregistrée n'est pas statistiquement significative (Lambin *et al.* 2001).

Eiri et Nieh ont fait le même essai à des doses différentes (exposition aiguë, 0,21 et 2,16 ng/abeille) et en testant spécifiquement les butineuses de pollen et celles de nectar. Chez les butineuses de nectar, la sensibilité au niveau de sucre est diminuée dès la plus petite de ces doses tandis que chez les butineuses de pollen, elle n'est diminuée qu'à partir de 2,16 ng/abeille (Eiri & Nieh 2012). Cet effet disparaît une heure après le traitement. Dans cette étude, les abeilles soumises à des essais en chambre de butinage n'en continuent pas moins de fréquenter le nourrisseur même lorsque la solution est très faiblement sucrée (ce à quoi on ne s'attend pas puisqu'en laboratoire elles montrent un seuil gustatif diminué);

on ne peut donc inférer des résultats d'un test PER en laboratoire le comportement qu'auront les abeille en champ, comme relevé par une précédente étude (Mujagic & Erber 2009 *in* Eiri & Nieh 2012)

5.5.6. Effets sur la capacité d'apprentissage

Les voies cholinergiques sont essentielles, au niveau notamment des corps champignons qui sont les centres d'intégration du cerveau de l'abeille. L'injection d'antagonistes nicotiniques (mecamylamine) et muscariniques (scopolamine) au niveau des lobes α des corps champignons[24] montre que c'est surtout l'antagoniste nicotinique qui endommage la capacité d'apprentissage de l'abeille : celle-ci est supprimée purement et simplement. Si l'apprentissage a déjà eu lieu lors de la contamination, l'extraction mémorielle est sévèrement diminuée, que l'apprentissage concerne la mémorisation des odeurs (Cano-Lozano *et al.* 2001) ou des textures (Dacher *et al.* 2005). Les récepteurs nicotiniques jouent donc un rôle essentiel dans les processus mémoriels de l'abeille (voir aussi Gauthier 2010).

De nombreux tests ont été faits sur base du réflexe d'extension du proboscis (PER test) pour déterminer l'effet de différentes concentrations d'imidaclopride sur les capacités mémorielles de l'abeille.

Decourtye *et al.* ont testé les réponses (PER) après exposition chronique à l'imidaclopride (1,5 à 48 ppb) tout au long de l'a vie de l'abeille (14 – 15 jours). Chez des abeilles prélevées en hiver à partir d'un rucher chauffé, le réflexe n'est affecté pour aucune des concentrations, mais les compétences d'apprentissage le sont à la concentration de 48 ppb. Chez les abeilles d'été, le réflexe est affecté à partir de 48 ppb et les compétences d'apprentissage le sont dès 12 ppb. Cette expérimentation conclut donc à une NOEC < 12 ppb. La différence entre abeilles prélevées l'hiver et l'été pourrait provenir soit de la saison (les abeilles d'hiver ont une physiologie différente de celles d'été), soit d'une plus grande richesse de l'alimentation en pollen qui, dans cette expérimentation, a été offerte aux abeilles d'hiver (Decourtye *et al.* 2003).

Decourtye *et al.* ont réalisé un test double, à la fois en tunnel sur fleurs artificielles, et en laboratoire par test PER, pour déterminer l'influence sur les capacités d'apprentissage de l'imidaclopride et de la deltaméthrine. L'imidaclopride était dosé à 24 ppb (la dose cumulée reçue sur les 6 jours de traitement est estimée à 10 ng/abeille); à cette dose aucun effet létal et aucun symptôme d'intoxication nerveuse (tel que tremblement, paralysie subite…) n'ont été constatés. Les abeilles qui ont été soumises au test du PER étaient collectées parmi les abeilles allant au nourrisseur, contaminé pendant le traitement, non contaminé ensuite. Le nombre de visites au nourrisseur et l'activité à l'entrée de la ruche ont été fortement réduits dès que le sirop a été contaminé à l'imidaclopride. Cette baisse d'activité s'est poursuivie après que la fin du traitement (au contraire de ce qui a été observé pour la deltaméthrine). L'imidaclopride réduit également (sans l'annuler complètement) la capacité de discrimination des odeurs de l'abeille. Les tests de laboratoire montrent que l'imidaclopride réduit la capacité d'apprentissage, durant le traitement mais aussi ensuite, y compris chez les abeilles colletées 9 jours après celui-ci (Decourtye *et al.* 2004).

Outre les effets sur le butinage, Ramirez-Romero *et al.* ont comparé les effets de la deltaméthrine, de l'imidaclopride (48ppb) et de la protéine Cry 1Ab sur la capacité d'apprentissage ; le test montre que l'imidaclopride induit une diminution de l'apprentissage olfactif mais celle-ci elle est suivie d'une récupération) (Ramirez-Romero *et al.* 2005). Lors de tests ultérieurs sur les mêmes substances, il apparaît que l'imidaclopride, d'ailleurs utilisé ici comme témoin positif (48 ppb toujours), affecte

[24] Ces lobes sont des voies de transit entre les centres récepteurs et intégrateurs dans le cerveau de l'abeille

autant la phase de conditionnement que la phase d'extinction et allonge le temps nécessaire à la prise du sirop (Ramirez-Romero *et al.* 2008).

Ces résultats (Ramirez-Romero 2005) sont conformes à ceux de Han *et al.* qui comparent les capacités d'apprentissages d'abeilles ayant ingéré du pollen traité à l'imidaclopride, et d'abeilles ayant ingéré du pollen traité à l'aide d'une protéine transgénique (coton CCR141), à celles d'abeilles de contrôle. Les capacités testées sont celles d'apprentissage olfactif par le PER et celles d'apprentissage visuel, qui sont évaluées au moyen d'un appareil en double T où l'abeille doit choisir la branche marquée par le « bon » signe pour arriver à une récompense sucrée. Si la protéine transgénique n'affecte aucune de ces capacités, l'imidaclopride (48ppb) les affecte toutes ; il est d'ailleurs à noter que dans cette étude-ci aussi, la substance est utilisée comme contrôle positif (Han *et al.* 2010).

Ces effets sur l'apprentissage varient avec l'âge de l'abeille. Le nombre d'essais nécessaires à l'habituation chez l'abeille diffère fortement entre les abeilles de 7 jours ou moins, dont l'habituation nécessite peu d'essais, et celles de 8 jours ou plus, qui en nécessitent davantage. Guez *et al.* ont testé l'effets de 0,1ng, 1 ng et 10 ng d'imidaclopride sur le nombre d'essais nécessaires à l'habituation. Ces dosages accroissent le nombre d'essais nécessaires chez les abeilles de 7 jours et le diminuent chez celles de 8 jours. D'autres effets, où interviennent des métabolites, surviennent après quelques heures : notamment, aux concentrations de 1 et 10 ng, Le nombre d'essais nécessaires est largement accru chez les abeilles de 8 jours (Guez *et al.* 2001).

L'acquisition du réflexe conditionné n'est pas le seul paramètre affecté par le contaminant. L'habituation (nombre d'essais sans récompense sucrée nécessaires à ce que l'abeille ne réagisse plus à l'odeur) l'est également : des abeilles traitées par 1,25 ng/abeille perdent le réflexe après 35 essais sans sucre, tandis qu'il en faut 50 aux abeilles de contrôle (Lambin *et al.* 2001).

Les effets sur l'apprentissage sont communs à de nombreux néonicotinoïdes, qu'ils soient nitro- ou cyano substitués. Ainsi par exemple, à doses très faibles, l'acétamipride décroît-il la mémoire olfactive à long terme (El Hassani *et al.* 2007).

5.5.7. Effets sur les tissus

Une étude réalisée en laboratoire sur des larves d'abeilles montre que l'imidaclopride, comme nombre d'autres pesticides, (insecticides mais aussi fongicides), accroît le nombre d'apoptoses[25] dans les tissus de l'intestin, des glandes salivaires et des tubes de Malpighi de la larve (Gregorc & Ellis 2011).

Des effets tissulaires de ce type peuvent également être observés chez l'adulte. Kakamand *et al.* ont montré ainsi que le thiamethoxam (un autre néonicotinoïde nitro-substitué) provoque une altération tissulaire de l'intestin qui va croissant avec la concentration administrée à l'abeille, la plus faible étant dans cette étude de 25 ppb (Kakamand *et al.* 2008).

L'imidaclopride affecte de nombreux paramètres influant sur le comportement et la santé de l'abeille. Des effets sont notés à des doses inférieures à 1 ng/abeille dans certaines études ; une étude par exposition chronique conclut à une NOEC inférieure à 12 ppb. Il est intéressant de noter que l'imidaclopride a, à très faible dose, un effet inverse (dynamisant) de celui qu'il a à des doses plus élevées (effet d'apathie).

[25] L'apoptose est la mort cellulaire par « suicide » de la cellule – la cellule déclenche elle-même le processus qui mène à sa propre disparition. Ce phénomène est normalement programmé génétiquement et mis en œuvre en réponse à un signal reçu par la cellule.

5.6. Particularités toxicologiques et hypothèses explicatives

5.6.1. Particularités toxicologiques

La toxicité de l'imidaclopride pour l'abeille montre certaines particularités par rapport à celle des autres molécules.

1. La DL_{50} est extrêmement variable selon les populations d'abeilles testées ; entre les résultats extrêmes le facteur est de plus de 100 (Suchail *et al.* 2001).
2. Cette variation est liée au profil de la courbe dose-réponse ; lorsque celle-ci montre un profil multiphase un premier pic de mortalité apparaît vers les 5 ng/abeille ; lorsque la courbe est monotone, la DL_{50} est proche de 70 ng/ab. (Suchail *et al.* 2000 ; Suchail *et al.* 2001).
3. La cinétique des mortalités est différée lorsque la dose s'accroît : les mortalités apparaissent plus rapidement à faible doses et plus tardivement aux doses les plus élevées (Suchail *et al.* 2000). Nauen *et al.* notent le même phénomène pour la toxicité de contact : certaines mortalités n'apparaissent que 24 heures après le traitement (Nauen *et al.* 2001b) (on relèvera qu'il en va autrement des effets sublétaux, cf. la publication de Yang et al. 2008 sur les effets sur le butinage).
4. Si les symptômes d'intoxication (tremblements, incoordination des mouvements, chutes…) apparaissent rapidement, les mortalités n'apparaissent que 4 heures après l'intoxication et se prolongent pendant plus de 96 heures (Suchail *et al.* 2003)
5. L'imidaclopride suscite, selon la dose, des effets sublétaux allant en sens contraires : l'abeille est dynamisée aux faibles doses, aux plus hautes doses elle devient apathique.

5.6.2. Rôle des pharmacophores dans la toxicité aiguë et chronique

Les hypothèses expliquant la plupart de ces particularités se fondent sur les spécificités pharmacologiques de la molécule-mère et de ses métabolites.

Parmi les métabolites de l'imidaclopride, seuls le 5-OH-imidaclopride et l'oléfine ont des toxicités aiguës proches de la molécule-mère (Suchail *et al.* 2001 ; les DL_{50} mesurées dans cette étude sont : imidaclopride, 37±10 ng/ab. ; 5-hydroxy, 222±25 ng/ab. : oléfine : 23±6 ng/ab.). L'oléfine est, de toutes les molécules imidaclopride comprise, celle qui a la plus forte affinité pour les nAChR et sans surprise, elle est aussi la molécule la plus toxique pour l'abeille (Schmuck *et al.* 2003). L'urée est relativement moins toxique, l'acide 6-chloro-nicotinique et le 4,5 hydroxy-imidaclopride le sont encore moins. Le desnitro-imidaclopride n'est pas toxique pour l'abeille en exposition aiguë (Suchail *et al.* 1999). Au total, les métabolites portant le groupement nitroguanidine présentent une toxicité aiguë du même ordre que celle de l'imidaclopride ; les métabolites ne le portant pas n'ont pas une toxicité aiguë élevée (fait exception à ce schéma le dihydroxy-imidacloprid qui porte ce groupement mais ne provoque pas de mortalité par exposition aiguë des abeilles (Schmuck *et al.* 2003)). Ce serait donc le groupement nitroguanidine qui serait le pharmacophore responsable de l'action toxique aiguë de la molécule.

Il en va autrement de la toxicité chronique. Les métabolites apparaissant non-toxiques lors des tests d'exposition aiguë apparaissent en effet toxiques par exposition chronique et cette toxicité varie peu avec la dose (Suchail *et al.* 2001). C'est le cas notamment de l'acide 6-chloronicotinique qui ne contient plus le groupement nitroguanidine ($-C=NNO_2$) mais contient toujours l'autre groupement, le radical 2-chloropyridinyl. L'explication de ce second mécanisme toxique résiderait dans la liaison du cycle chloropyridinyl à un second récepteur dont la forte affinité permet la liaison même à très faibles doses. (Suchail *et al.* 2001, Kamel *et al.* 2010).

5.6.3. Hypothèses explicatives

A vu de ce qui précède, les hypothèses explicatives des particularités relevées plus haut sont comme suit :

1. La variabilité entre tests pourrait être due à des différences de capacité de détoxification entre lots d'abeilles testées (Suchail *et al.* 2001), cette différence pouvant être liée au statut nutritif des abeilles ou à la différence d'âge entre lots (Nauen *et al.* 2001b),
2. Le profil multiphase de la courbe dose-réponse pourrait s'expliquer par le fait que les deux populations de récepteurs évoquées ci-dessus ont des effets opposés. A faible dose, seuls les récepteurs à forte affinité se lient (avec le radical chloropyridinyl) et produisent un effet létal. A plus forte dose, les autres récepteurs commencent aussi à se lier (avec la nitroguanidine), et annulent l'effet du premier mécanisme toxique (Suchail *et al.* 2001). A plus forte dose encore, ce second mécanisme, qui est en fait le mécanisme principal, l'emporte sur le premier qui n'arrive plus à le compenser ; il détermine alors la toxicité qui entraîne le second pic de mortalité.
3. Quant à la cinétique toxique (la mortalité est différée et la durée du délai est *grosso modo* proportionnelle à la dose) : il se pourrait qu'aux faibles doses, les métabolites toxiques soient responsables de la mortalité rapide ; les doses moyennes déclencheraient la production d'enzymes de détoxification, abaissant ou retardant la mortalité ; aux doses élevées, le système de détoxification commence par jouer puis est saturé, les métabolites entrainant alors la mortalité puisqu'ils ne peuvent plus être détoxifiés par l'organisme de l'insecte (Suchail *et al.* 2000). L'explication donnée en 2 constitue une hypothèse alternative.
4. Quant au fait que la mortalité apparaît environ 4 heures après l'ingestion ; à ce moment se produit un pic (en quantité) des deux métabolites toxiques (5-OH-imidaclopride et oléfine), ce qui suggère que, si les symptômes d'intoxication nerveuse sont dus à la molécule-mère, la mortalité, elle, est liée à ces métabolites (Suchail *et al.* 2003). De même l'accroissement de l'effet sur la mobilité 30 min après l'exposition constaté par Lambin *et al.*, serait-il du à l'apparition des métabolites (Lambin *et al.* 2001). La survenue de la mort après quelques heures peut également être due à la paralysie ou à l'altération du tube digestif, conduisant l'insecte à la dessiccation et/ou à la mort par famine (Kakamand *et al.* 2008).
5. Le fait que les effets aux faibles doses jouent à l'opposé des effets à forte dose va dans le sens de l'hypothèse déjà relevée plus haut, que les deux populations de récepteurs capables de se lier à l'imidaclopride et à certains de ses métabolites ont des effets opposés.

NB : Les hypothèses évoquées en 2. et 3. pourraient expliquer les divergences entre les études Suchail *et al.* 2001 et Decourtye *et al.* 2003, les seconds ayant travaillé avec des doses plus élevées que les premiers.

Les particularités de la cinétique toxicologique de l'imidaclopride posent question quant à la pertinence des durées d'observations requises par les lignes-guides relatives à l'évaluation des substances toxiques, qui prévoient des durées d'observation n'excédant pas 48 heures.

Bien plus largement, les particularités toxicologiques de cette substance mettent en cause la théorie selon laquelle « la dose fait le poison », sur laquelle sont fondées les notions de DL_{50}, de NOEL et de NOED. Pour certains toxiques en effet, une exposition de longue durée à des doses faibles peut avoir les mêmes effets qu'une exposition de courte durée à des doses importantes (loi de Haber, équations de Druckrey-Küpfmüller); et des effets finissent

par apparaître à des doses excessivement faibles pourvu que la durée d'exposition soit suffisamment longue. C'est le cas en particulier si le toxique est fortement lié au site actif, et les néonicotinoïdes entrent dans ce schéma, parce que à la fois : (1) ils se lient de façon virtuellement irréversible aux récepteurs nicotiniques (Abbink 1991) et (2) la constance du produit [concentration x durée d'exposition] a été observée pour cette substance chez certaines espèces (la Daphnie *Daphnia magna* et l'ostracode d'eau douce *Cypridopsis vidua*) (Sanchez-Bayo 2009). Le profil multiphase de la courbe dose-réponse met également en question les notions classiques de toxicologie. Il est à noter par ailleurs, que ce caractère multiphase se retrouve dans des études concernant d'autres types de molécules ; on le retrouve ainsi dans une étude relative aux effets de deux pyréthrinoïdes sur les ATPases de cellules cérébrales du rat (Kakko *et al.* 2003).

Aussi les règles d'évaluation fondées sur les DL_{50} aiguës, les NOEC et les NOED sont-elles aujourd'hui remises en question, et une nouvelle approche écotoxicologique se dessine, qui consiste à étudier le temps de réponse des individus au même titre que les doses ou concentrations toxiques afin de mesurer des ET_{50} (temps nécessaire à obtenir 50% de mortalité) par concentration. Une telle méthode permet l'évaluation des risques de substances toxiques pour lesquelles l'établissement d'une NOED ou d'une NOEC par les méthodes habituelles pose problème (Sanchez-Bayo 2009, Tennekes 2010, Tennekes & Sanchez-Bayo 2011).

6. Synergies

6.1. Synergies avec d'autres molécules

Les néonicotinoïdes sont des synergiques des fongicides metalaxyl M et benalaxyl M (phénylamides) selon un brevet dont le dépositaire est Bayer CropScience (Krohn *et al.* 2008). Selon les termes de ce brevet, … *des mélanges comprenant au moins un composé du groupe des néonicotinoïdes mentionnés ci-dessous et au moins l'un des isomères purs des dérivés d'acides aminés benalaxyl M ou metalaxyl M ont une efficacité synergique et sont particulièrement indiqués pour contrôler les pestes* [0007]. Un avantage supplémentaire est l'activité insecticide accrue par synergie du mélange concerné par l'invention, en comparaison avec le composé à activité insecticide pris individuellement, qui dépasse l'activité attendue des deux substances actives lorsqu'elles sont appliquées individuellement [0050]. En conséquence, des quantités de substances actives moindres peuvent être utilisées, avec un effet similaire [0007].

Cette synergie est également utilisable pour les biocides : *les combinaisons de substances actives suivant la présente invention sont également valables pour contrôler les pestes animales, en particulier les insectes, qui se trouvent dans des espaces clos comme, par exemple, les habitations, les halls d'entreprises, les bureaux, les cabines de véhicules et toutes choses semblables. Elles peuvent être utilisées dans les produits insecticides domestiques pour contrôler les pestes, soit seules, soit en combinaison avec d'autres substances actives ou auxiliaires. Elles sont actives contre les espèces sensibles ou résistances à tous les stades de développement* [0109].

Les substances agonistes des récepteurs nicotiniques, dont l'imidaclopride, sont également prescrites en mélange synergique avec d'autres fongicides et avec le fipronil (Brevet Jamet *et al.* 2010).

En revanche, les inhibiteurs du cytochrome P450 (piperonyl butoxyde, fongicides azoles) n'ont qu'un effet synergique limité sur l'imidaclopride (toxicité accrue d'un facteur 1,5 à 1,9). Le cytochrome P450 intervient dans les réaction d'oxydation du métabolisme, et donc dans la détoxification dans la mesure où l'oxydation d'un composé toxique a pour effet la production de métabolites moins toxiques que le composé parent. On peut déduire, du peu d'effet synergisant d'une substance comme le PBO, que cette voie de détoxification n'est pas significative s'agissant de l'imidaclopride (Iwasa *et al.* 2004).

6.2. Synergies avec les agents pathogènes

Les synergies substances-pathogènes sont mal connues à ce jour. Les seules études existantes à notre connaissance concernent, en fait de pathogène, le microsporidien *Nosema sp.*, parasite opportuniste des ruches.

Ce choix n'est pas dû au hasard. De manière générale, on peut s'attendre à ce que l'addition de deux agents stressants tels qu'une infection et une contamination ait au moins un effet additif sur la colonie ; en effet, les mécanismes immunologiques et de détoxification consomment tous deux l'énergie de l'abeille. *Nosema* ajoute à cela une particularité : la microsporidie consomme l'ATP de son hôte faute d'être capable de pourvoir à ses propres besoins énergétiques[26] et de ce fait accroît la consommation de sucre de l'abeille. En conséquence, *Nosema* accroît l'exposition de l'abeille au contaminant lorsque celui-ci est présent dans le nectar (Alaux *et al.* 2009, Vidau *et al.* 2011). *Nosema sp.* est donc un parasite dont les effets synergisants avec les xénobiotiques sont attendus sur le plan théorique.

6.2.1. L'étude Alaux *et al.* 2009

Alaux *et al.* ont soumis des abeilles en cagettes (30 abeilles) soit à l'infection par *Nosema*, soit à la contamination par l'imidaclopride (0,7, 7 et 70 ppb, exposition 10 h/jour en continu), soit aux deux traitements à la fois ; ils ont analysé différentes enzymes relatives au système immunitaire chez les abeilles traitées, ainsi que la consommation de sucre et la mortalité à 10 jours. Le traitement double accroît significativement la mortalité par rapport au contrôle et aux traitements simples, sur le mode additif pour les deux concentrations les plus basses (> 45% de mortalité à 7 ppb), et avec une forte potentialisation à la concentration la plus élevée (>70% de mortalité à 70 ppb). L'étude montre pourtant, au contraire de celle de Pettis *et al.*, un léger effet inhibiteur de la molécule sur le taux de germination des spores de *Nosema sp.* dans l'intestin de l'abeille. Mais surtout, les deux contaminations combinées ont un effet qu'aucune des deux n'a séparément : par action synergique elles diminuent l'activité de la glucose-oxydase, une enzyme de l'immunité sociale de l'abeille, dont l'utilité est de désinfecter les réserves de miel et la nourriture larvaire par production de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée, H_20_2). Non seulement l'effet combiné accroit la mortalité, mais parallèlement il affaiblit la résistance de la colonie aux maladies.

Le même type de synergie a été démontré avec un autre néonicotinoïde (cyano-substitué), le thiaclopride ; le 1/100ème de la DL_{50} constitue une dose suffisante pour accélérer et amplifier fortement la mortalité liée à l'infection par *Nosema ceranae* (Vidau *et al.* 2011).

6.2.2. L'étude Pettis *et al.* 2012

Pettis *et al.* ont nourri des colonies pendant 10 semaines à l'aide de suppléments protéinés contaminés à l'imidaclopride (5 et 20 ppb) ou on (contrôles). A 5 et 8 semaines, ils ont emmené des cadres de couvain naissant en laboratoire où des abeilles nouvellement émergées ont été nourries pendant 2 jours avec un sirop contenant des spores de *Nosema* (*N.apis* et *N.ceranae*). Le niveau de multiplication de *Nosema* s'est révélé être plus de trois fois supérieur chez les abeilles contaminées, par rapport aux contrôles. L'imidaclopride favorise donc l'infection par *Nosema*, parasite opportuniste de l'abeille.

[26] Nosema sp. ne possède pas de mitochondries et est incapable de réaliser la phosphorylation oxydative

7. Effets sur d'autres espèces

7.1. Autre pollinisateurs

Les autres pollinisateurs sont également exposés à l'imidaclopride. Les bourdons, abeilles sauvages coloniales, et les Mégachiles et les Osmies, abeilles sauvages solitaires, sont les espèces les plus étudiées vu leur importance économique : elles constituent en effet une alternative aux abeilles mellifères pour la pollinisation, un usage qui tend à se développer vu les difficultés croissantes des apiculteurs, américains notamment, à conserver leurs colonies (Abbott *et al*. 2008).

7.1.1. Les bourdons (*Bombus sp.)*

Si les bourdons butinent dans un rayon plus restreint que l'abeille mellifère, ils peuvent butiner quasiment exclusivement un seul type de floraisons s'il se trouve à proximité de leur nid (Tasei *et al*. 2000). Le bourdon ingérant de plus grandes quantités de nectar, son exposition potentielle est plus élevée : si la concentration en imidaclopride dans le nectar est de 1,63 ppb (ce qui est dans la moyenne des concentrations relevées en champ) il ingérera quotidiennement, en moyenne, 587 pg de la substance active (Laycock *et al*. 2012). L'imidaclopride est répulsif, dès 1 ppb et surtout aux dosages plus importants, que ce soit pour le nectar ou le pollen ; mais, même si la consommation de ces matrices est réduite à ces concentrations, le bourdon n'en ingèrera pas moins des quantités substantielles de la matière active (Laycock *et al*. 2012).

Mommaerts *et al*. ont testé sur *Bombus terrestris* une méthode utilisant des micro colonies de 5 individus pour tester notamment le butinage : un dispositif oblige les bourdons à passer dans une tube de 20 cm ; même si cette distance est bien plus courte que la distance réelle de butinage qui peut aller jusqu'à 800m, ce dispositif permet de mettre en évidence d'éventuels problèmes liés aux contaminations dans le comportement de butinage de cette espèce. L'étude compare les données de toxicité selon que l'on inclut ou non le butinage (nourrissage dans le nid même ou à l'autre extrémité du tube). Dans le premier cas la CL_{50} est de 59 ppb, dans le second elle est de 20 ppb ; la concentration médiane pour les effets sublétaux (EC_{50}) est de 37 ppb dans le premier cas et de 3,7 ppb dans le second cas. Les auteurs observent que ces effets se produisent pour des concentrations pertinentes sur le plan environnemental. Ils concluent sur la nécessité de prendre en compte l'observation des effets sublétaux, comme ici le butinage, dans l'évaluation des risques des pesticides pour les pollinisateurs sauvages. Cette même étude relève également des problèmes de fécondité : plus aucune reproduction n'a lieu à 10 et 20 ppb (Mommaerts *et al*. 2010).

D'autres essais, réalisés en nourrissant des microcolonies de *Bombus* avec du sirop contaminé, montrent également que ce dernier a pour effet une réduction de la fécondité. Whitehorn *et al*. ont étudié les effets de l'imidaclopride sur le développement et la reproduction des colonies de bourdons. 75 colonies de *Bombus terrestris* ont été divisées en 5 groupes : un contrôle, un traitement « bas » (0,7ppb dans le sirop et 6 ppb dans le pollen) et un traitement « haut » (le double de ces doses). Les colonies traitées ont montré un développement moindre que les contrôles : à la fin de l'expérience, le poids des colonies ayant reçu les traitements « bas » et « haut » était en moyenne inférieur à celui du contrôle de 8 et 12% respectivement. Toutefois, le fait marquant est la diminution drastique du nombre de reines élevées dans les colonies traitées, une diminution qui est sans proportion avec celle du développement des colonies. Alors que les colonies de contrôle ont produit en moyenne 13-14 reines, celles traitées n'en ont élevé que 2 (traitement « bas ») et 1,4 (traitement « haut ») en moyenne. Cela s'explique par le fait que de manière générale, seule les fortes colonies élèvent des reines, de sorte qu'un fléchissement de croissance, même modique, se traduit par une chute importante du nombre de reines élevées. La conséquence en est que des contaminants en trace, dès

lorsqu'ils portent atteinte, même faiblement, au développement des colonies de *Bombus*, peuvent avoir un effet sévère sur les populations de cet Hyménoptère (Whitehorn *et al.* 2012).

Ces résultats concordent avec ceux d'une autre étude, anglaise également, qui montre que à la concentration de 1 ppb la fécondité de la reine est diminuée de plus du tiers (42%). L'imidaclopride aux dosages testés n'affectera toutefois pas le développement des larves (Laycock *et al.* 2012).

Tasei *et al.* constatent également la réduction du nombre des larves en exposant des colonies, de taille normale cette fois, à du sirop contaminé à 10 ppb ou à du pollen contaminé à 6 ppb (Tasei *et al.* 2001 *in* Decourtye & Devillers 2010).

7.1.2. Osmies et Megachiles

La dose létale 50 (DL_{50}) de l'imidaclopride, par exposition aiguë, est la même pour l'abeille mellifère et pour deux autres genres d'abeilles, *Megachile rotundata* et *Nomia melanderi* (Stark et al. 1995 in Decourtye et al. 2010).

Les larves d'Osmies mettent plus de temps à se développer lorsqu'elles sont nourries avec du pollen contaminé à l'imidaclopride, un effet qu'on constate au champ aussi bien qu'en laboratoire ; cet effet est toutefois mineur (Abbott *et al.* 2008).

Une étude canadienne a mesuré la toxicité par contact de cinq pesticides (dont l'imidaclopride, la clothianidine et la deltaméthrine) chez un bourdon (*Bombus impatiens*), une Mégachile (*Megachile rotundata*) et une Osmie (*Osmia lignaria*). Son intérêt est qu'elle montre que le rapport entre les toxicités d'une même substance pour les trois espèces n'est pas constant d'une substance à une autre. En d'autres termes, on ne peut déduire, de la toxicité pour une espèce, celle qu'aura la substance ou le produit pour une autre espèce, et l'étude plaide pour que l'évaluation des substances chimiques prenne en compte des espèces pollinisatrices autres que l'abeille mellifère (Scott-Dupree *et al.* 2009).

7.2. Autres compartiments de l'environnement

On s'écarte ici de l'abeille et les autres compartiments de l'environnement n'ont pas fait l'objet d'une analyse détaillée de la littérature, ce qui aurait plus que doublé le volume de ce travail. Les études reprises ci-dessus sont celles croisées au détour d'une étude intéressant la contamination de milieux que l'abeille est susceptible de fréquenter. En ce qui concerne le milieu aquatique, l'étude de Sanchez-Bayo valait d'être brièvement notée, car elle montre que l'évolution qui se fait jour dans l'approche écotoxicologique ne concerne pas que l'abeille ; et vient appuyer l'idée, que les spécificités toxicologiques des néonicotinoïdes pourraient bien bouleverser les notions servant actuellement de base aux approches d'évaluation.

7.2.1. Effet sur la décomposition de la matière organique

Quoiqu'une étude ait réussi à isoler une lignée de bactéries capables de dégrader l'imidaclopride (Anhalt *et al.* 2007), cette molécule, globalement, ralentit la décomposition de la matière organique par son action sur les micro- et sur les macroinvertébrés du sol et de l'eau. Dans les milieux aquatiques, les deux types de dégradation (macro-et microorganismes) sont également handicapées tandis que dans le sol, l'effet sur les microorganismes n'est perçu qu'aux plus hautes concentrations testées (dès 11 mg/kg) ; dans le sol, l'effet sublétal sur les vers de terres (moindre consommation) est par contre significatif à toutes les concentrations testées (c'est à dire dès 3 mg/kg) (Kreutzweiser *et al.* 2008).

7.2.2. Milieu aquatique

Tisler *et al*. ont testé la toxicité de l'imidaclopride et de la préparation Confidor® sur plusieurs organismes aquatiques (une bactérie, une algue, un crustacé, un poisson). *Daphnia magna* est l'espèce la plus sensible avec une EC_{50} de 56,6 mg/L pour l'imidaclopride même, de 0,018 % en volume pour le Confidor® (soit 30 mg/L d'Imidaclopride pur), une différence qui serait due à l'effet combiné (synergique) de la formulation et de la substance active. La NOEC à 21 jours est de 1,25 mg/L. (Tisler *et al*. 2009).

Toutefois dans ce domaine aussi, l'approche toxicologique actuelle montre des failles. Une étude menée sur des champs expérimentaux de riz montre que les effets de la toxicité de l'imidaclopride sur l'écosystème dépasse de loin ce qu'on pourrait attendre au vu des DL_{50} relatives aux espèces usuellement testées comme représentant le milieu aquatique, notamment à cause d'un effet domino ; en l'occurrence, la chute des populations de zooplancton a pour effet la diminution de la turbidité des eaux, avec pour conséquence un développement incontrôlé d'algues filamenteuses et un accroissement du PH de l'eau qui compromet le développement de la flore semi-submergée. Aussi les auteurs de l'étude prônent-ils une nouvelle approche toxicologique prenant en compte des facteurs tels la persistance, la bioaccumulation, la probabilité d'exposition pour évaluer le risque sur l'écosystème considéré comme un tout (Sanchez-Bayo & Goka 2006).

8. L'imidaclopride dans les biocides en Belgique

Les usages biocides de l'imidaclopride en Belgique sont limités à la lutte contre les mouches, les fourmis, les blattes et les moustiques.

Six produits sont autorisés, ils sont listés dans le tableau Excel figurant en annexe. Aucun d'entre eux n'est classé. Deux d'entre eux (des stickers anti-mouches) portent le pictogramme « dangereux pour l'environnement » ; parmi eux, Bayer Attrape-mouches, ce qui est assez piquant car le fabricant, sur la page réservée à son produit, mentionne « *ce produit est absolument non toxique, inodore et efficace durant toute une saison* »[27].

L'usage d'un seul d'entre eux – Maxforce White gel, lutte contre les blattes - est réservé aux professionnels. Les cinq autres sont autorisés en usage domestique ; toutefois Quick Bait, par sa formule, n'est vraisemblablement pas utilisé au quotidien par Mr ou Mme Tout-le-monde, puisqu'il s'agit d'un granulé appât pouvant être mis en solution, destiné à la lutte contre les mouches à grande échelle, bâtiments industriels et d'élevage. La plupart de ces produits sont des appâts, et l'appât usuellement utilisé est… le miel (stickers, Fourmibox).

8.1. Les actes d'autorisation

Un coup d'œil sur les actes d'autorisation permet de voir que les phrases de risque relatives à ces produits, et concernant l'environnement, portent

- sur la toxicité pour les milieux aquatiques (R 51 : toxique pour les organismes aquatiques ; R52 : Nocif pour les organismes aquatiques ; R53 : peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique)
- sur les modes d'élimination :
    - S56 : Eliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux
    - S60 : Eliminer le produit et son récipient comme déchet dangereux)

[27] Source: site de BayerGarden: http://bayergarden.be/SCGARDENBLX/products_befr.nsf/CMSSubjectByID/SQUN-6DTH2802ec.html?OpenDocument

- S61 : Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/ la fiche de données de sécurité

En outre, pour Fourmibox il est recommandé ne pas laisser la boîte à la pluie pour éviter le lessivage du produit, mais la raison invoquée relève de l'efficacité du produit et non de sa toxicité pour l'environnement.

De même que pour le fipronil, il y a de petites différences entre des produits pourtant similaires, notamment :

- pas de pictogramme N pour Vapona Window stickers, alors que les deux autres stickers portent ce pictogramme sur l'emballage ;
- en ce qui concerne les phrases de risque pour le milieu aquatique, Maxforce White gel, Quick Bait et Vapona sticker n'en portent aucune ; parmi les trois autres, Pyrel a la phrase 51 tandis que les deux autres ont la phrase 52

8.2. Exposition de l'abeille aux biocides à base d'imidaclopride

Comme pour le fipronil, l'exposition de l'abeille à l'imidaclopride peut se faire soit au travers des matrices consommées par l'insecte (nectar, pollen ou eau) soit de façon indirecte, par le biais de la contamination de l'environnement.

L'imidaclopride est une molécule persistante on l'a vu (DT_{50} normalisées de plus de 550 jours dans certaines conditions) et susceptible d'accumulation dans les sols. La molécule est hautement systémique et, absorbée au niveau des racines, elle contamine le nectar, le pollen et les eaux d'exsudation éventuellement rejetées par la plante. L'imidaclopride est retrouvé dans la moitié des échantillons de pollen récoltés aléatoirement en France ; il est ainsi le contaminant le plus fréquent du pollen dans cette étude de survey, suivi immédiatement par son principal métabolite, l'acide 6-chloronicotinique. De même, la molécule contamine les eaux, à tout le moins celle ruisselant des surfaces où la molécule est employée ; et malgré que dans l'eau sa demi-vie soit limitée par la photolyse, on a vu au travers des études californienne et néerlandaise que la molécule pouvait contaminer largement les eaux de surface. Tout comme pour le fipronil, aucune source n'est donc à négliger.

Les chiffres de vente ne concernent que 3 des produits ci-dessous : Fourmibox (de loin le produit le plus vendu), Maxforce White et Quick Bait. Les trois autres sont des stickers anti-mouches pour lesquels aucun chiffre n'est fourni (mais deux d'entre eux au moins sont en vente en Belgique, Bayer attrape-mouches et Vapona window sticker). Les quantités de ces produits vendues en Belgique sont marginales mais néanmoins en croissance. Parmi eux, c'est Quick Bait qui est le plus susceptible de prêter à une exposition significative de l'abeille, en cas de ruissellement vers des lieux d'abreuvement. Les stickers d'usage domestique peuvent également concerner des individus mais ce type d'exposition est vraiment très marginal.

Toutefois, les usages biocides en Belgique sont pour l'essentiel limités à des produits ne donnant lieu qu'à des applications ponctuelles ; c'est le cas en particulier des stickers et des boîtes appâts pour les fourmis. Un seul produit fait exception : Quick Bait, dont l'usage peut donner lieu à des ruissellements importants avec formations de flaques où les abeilles sont susceptibles d'aller s'abreuver. Ce type d'usage est la cause vraisemblable d'incidents survenus en France lors de la lutte contre le culicoïde du mouton, agent vecteur de la fièvre catarrhale ovine ; nous y reviendrons à propos des pyréthrinoïdes.

8.3. Recommandations

Comme le fipronil, l'imidaclopride est extrêmement toxique pour les abeilles et pour l'entomofaune en général. Aucune source n'est donc à négliger. Outre ce qui figure dans

les recommandations générales (en conclusion de ce rapport), nous faisons les recommandations particulières suivantes :

- veiller à la cohérence des phrases de risque pour le milieu aquatique
- Quick Bait et Maxforce White gel sont les deux seuls produits à pouvoir être utilisés en dehors du support d'application. A notre sens, chacun de ces deux produits devraient porter le pictogramme N, la phrase de risque R 57 et la phrase de risque 61, de même qu'une préconisation relative à l'élimination.
- Quick Bait au moins devrait porter une mention de type « *Attention, la matière active de ce produit (imidaclopride) est toxique pour les abeilles et les insectes utiles. Ne pas utiliser en milieu extérieur dans les endroits où le butinage est possible* ».

Bibliographie :

Abbink J, 1991: The biochemistry of Imidacloprid, Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 42 (2): 183-195 (abstract)

Abbott VA, Nadeau JL, Higo HA et al., 2008: Lethal and sublethal effects of imidacloprid on Osmia lignaria and clothianidin on Megachile rotundata (Hymenoptera: Megachilidae). J Econ Entomol 101(3):784-796.

Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP and Le Conte Y, 2009: Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (Apis mellifera), Environmental microbiology 12 (3): 774-782

Alix A and Vergnet Chr, 2007: Risk assessment to honey bees: a scheme developed in France for non-sprayed systemic compounds, Pest Manag Sci.63: 1069-1080

Anhalt JC, Mooman TB and Koskinen WC, 2007: Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism, Journal of Environmental Science and Health B 42: 509-514

Armengaud C, Aït-Oubah J, Causse N, Gauthier M. 2001. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain. Neuroscience Letters 304: 97–101.

Armengaud C, Lambin M, Gauthier M (2002) Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honeybee. In: Devillers J, Pham-Delègue MH (eds) Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 85– 100 (abstract)

Bailey J, Scott-Dupree C, Harris R, Tolman J and Harris B, 2005 : Contact and oral toxicity to honeybees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada, Apidologie 36 : 623-633.

Baskaran S, Kookana RS and Naidu R, 1999: Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates, Pestic Sci 55: 1222-1228

Belzunces, LP, Tchamitchian S and Brunet JL, 2012: Neural effects of insecticides in the honey bee, review, Apidologie, INRA, DIB and Springer-Verlag, DOI: 10.1007/s13592-012-0134-0

Blacquière T, Smagghe G, van Gestel CAM and Mommaerts V, 2012: Neonicotinoides in bees: a review on concentrations, side effects and risk assessment, Ecotoxicology, DOI 10.1007/s10646-012-0863-x

Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fléché C, Colin ME abd Bengsch ER, 2003: A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants and in pollens, American Chemical Society, Anal. Chem. 75: 2027–2033.

Bonmatin, JM., Marchand, P., Charvet, R., Moineau, I., Bengsch, E.R., Colin, M.E., 2005a : Quantification of Imidacloprid Uptake in Maize Crops, J. Agric. Food Chem., 53, 5336 – 5341

Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Colin ME, Fleche C and Bengsch ER, 2005b: Behaviour of Imidacloprid in Fields. Toxicity for Honey Bees In Environmental Chemistry, Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems; Lichtfouse E, Schwarzbauer J and Robert D, Eds, Springe, New York, pp 483-494

Bortolotti L, Montanari L, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S and Porrini Cl, 2003: Effects of sublethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees, Bulletin of insectology, 56 : 63 – 67

Bortolotti L, Sabatini AG, Mutinelli F, Lavazza A, Piro R, Tesoriero D, Medzrycki P and Porrini Cl, 2009: Spring honey bee losses in Italy, Julius-Kühn Institut Archiv 423: 148-152

Cano-Lozano, V., Armengaud, C. and Gauthier, M., 2001: memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybees, J Comp Physiol A 187: 249-254.

Chauzat MP, Martel AC, Cougoule N, Porta P, Lachaise J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P and Faucon JP, 2011: An assessment of honeybee colony matrices, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France: Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 30 (1): 103–111

Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S and Vermandere JP, 2004: A method to quantify and analyse the foraging activity of honeybees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides, Arch. Environn. Contamin. Toxicol. 47, 387 – 395

Cresswell JE, 2010: A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honeybees, Ecotoxicology, DOI 10.1007/s10646-010-0566-0, published online

Dacher M, Lagarrigue A and Gauthier M, 2005: Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics, Neuroscience 130: 37–50.

Dechaume-Moncharmont FX, Decourtye A, Hennequet C *et al*. 2003: Statistical analysis of the honeybee survival after chronic exposure to insecticides. Environ Toxicol Chem 22(12): 3088-3094.

Decourtye A, Le Metayer M, Pottiau H, Tisseur M, Odoux JF and Pham-Delègue MH, 2000: Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidacloprid, in Hazards of pesticides to bees, ed. by Belzunces LP, Pélissier C and Lewis GB, INRA, Avignon, France: 113–117 PAS SUR LE NET – demander Axel

Decourtye A, Lacassie E and Pham-Delègue M-H, 2003: Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season, Pest Manag Sci 59: 269–278

Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M and Pham-Delègue MH, 2004a: Effect of Imidacloprid and Deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions, Ecotoxicology and Environmental Safety, 57, 410 – 419

Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M and Pham-Delègue MH, 2004: Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (Apis mellifera L), Pestic. biochem. physiol. vol. 78 (2):83-92

Decourtye A and Devillers J, 2010: Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees, Advances in Experimental Medicine and Biology 683: 85-95

Déglise P, Grünewald B and Gauthier M, 2002: The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. Neurosci Lett 321: 13–6.

Dively GP and Kamel A, 2012: Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators, Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 4449-4456.

EFSA 2008 : Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Imidacloprid, 29 may 2008, available on line: www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/148r.pdf

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2012: Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera, Bombus spp*. and solitary bees), EFSA Journal 2012;10(5) 2668, 275 pp., doi:10.2903/j.efsa.2012.2668. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

Eiri DM and Nieh JC, 2012: A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing, The Journal of Experimental Biology 215: 2022-2029

El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin L, Gauthier M and Armengaud C, 2007: Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (Apis mellifera, Arch Environ Contam Toxicol. 54(4): 653-61.

Faucon JP, Aurières C, Drajnudel P *et al.*, 2005: Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honeybee (*Apis mellifera*) colonies, Pest Manag Sci 61: 111–125

Forster R, 2009: Bee posoining caused by insecticidal treatment of maize in Germany in 2008, Julius-Kühn Archiv 423: 126-133

Gauthier M, 2010: State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory, Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors (New York: Springer), S.H. Thany éd. 683: 97-115.

Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C and Tapparo A, 2009: Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees, J. Econ. Entomol. 102 (5): 1808-1815

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Greatti M, Giorio C, Marton D and Tapparo A, 2011: Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication, J. Appl. Entomol., DOI: 10.1111/j.1439-0418.2011.01648

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Giorio C, Marton D and Tapparo A, 2012: Aerial powering of beees inside mobile cages and the extend of neonicotinoid cloud surrounding corn drillers, Journal of Applied Entomology, doi: 10.1111/j.1439-0418.2012.01718.x

Greatti M, Barbattini R, Stravisi A, Sabatini AG and Rosi S, 2006: Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho® dressed seeds, Bulletin of Insectology, 59 (2): 99–103

Gregorc A and Ellis JD, 2011: Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (Apis mellifera L.) larvae treated with pesticides, Pesticide Biochemistry and Physiology 99: 200–207

Guez, D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R and Belzunces LP, 2001: Contrasting effects of Imidacloprid on habituation in 7- and 8- days-old honeybees, Neurobiology of Learning and Memory, 76 (2), 183–191.

Gupta S, Gajbhiye VT, Kalpana and Agnihotri NP, 2002: Leaching Behavior of Imidacloprid Formulations in Soil, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68: 502–508

Gupta M, Sharma A and Shanker A, 2008: Dissipation of Imidacloprid in Orthodox tea and its transfer from made tea infusion, Food Chemistry 106: 158-164

Han P, Niu C-Y, Lei C-L, Cui J-J and Desneux N, 2010: Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. Ecotoxicology 19: 1612–1619

Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S and Decourtye A, 2012: A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees, Science 336 (6009) : 348-350

Hoffmann EJ and Castle SJ, 2012; Imidacloprid in Melon guttation fluid: a potential mode of exposure for pest and bénéficial organisms, Ecotoxicology 105 (1): 67–71

Illarionov A, 1991: Toxic effects of some insecticides on the honeybee. Agrokhimiya 8: 121–125.

Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT and Roe M, 2004: Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honeybee, Apis mellifera, Crop Protection 23 (2004) 371–378

Jamet L, Gehrart RW and Voeste D, 2011 for BASF SE (Ludwighaven) : US Patent Application US 2011/0046123 A1, (synergies fipronil – neonics—fungicides), : http://www.freepatentsonline.com/y2011/0046123.html

Juraske R, Castells F, Vijay A, Muñoz P and Antón A, 2009: Uptake and persistence of pesticides in plants : Maesurements and model estimates for imidacloprid after foliar and soil application, Journal of Hazardous Materials 165 : 683-689

Kakamand FAK, Mahmoud TT and Amin ABM, 2008: The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honeybee apis mellifera l. workers. Journal of Dohuk University 11 (1): 144-151

Kakko I, Toimela T and Tähti H, 2003: The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin, Chemosphere 51: 475–480

Kamel A 2010: Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their métabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography – tandem mass spectometry (LC/MS-MS), J. Agric. Food Chemistry 58 : 5926-5931

Kreutzweiser DP, Good KP, Chartrand DT, Scarr TA and Thompson DG, 2008: Are leaves that fall from imidacloprid-treated maple trees to control Asian longhorned beetles toxic to non-target decomposer organisms? J. Environ. Qual. 37, 639–646

Krohn PW et al., 2008: US Patent, US 2008/0261811 A1 (synergies betalaxyl M – metalaxyl M and neonicotinoids, available online: http://www.faqs.org/patents/app/20080261811

Lambin M, Armengaud C, Raymond S and Gauthier M, 2001: Imidacloprid-Induced Facilitation of the Proboscis extension Reflex Habituation in the Honeybee , Archives of Insect Biochemistry and Physiology 48: 129–134

Laurent FM and Rathahao E, 2003: Distribution of 14C-imidacloprid in sunflowers (Helianthus annus L.) following seed treatment. J Agric Food Chem 51:8005–8010

Laycock I, Lenthall KM, Baratt AT and Cresswell JE, 2012: Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumblebees (*Bombus terrestris*), Ecotoxicology, published online, DOI 10.1007/s10646-012-0927-y.

Lu C, Warchol KM and Callahan RA, 2012: In situ replication of honey bee colony collapse disorder, Bulletin of Insectology 65 (1), disponible sur internet: http://stream.loe.org/images/120406/Lu%20final%20proof.pdf

Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M and Sattelle DB, 2001: Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, Review, Trends in Pharmacological Sciences 22 (11): 573-580

Marzaro M, Vivan L, Targa A, Mazzon L, Mori N, Greatti M, Petrucco Toffolo E, Di Bernardo A, Giorio C, Marton D, Tapparo A and Girolami V, 2011 : Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat, Bulletin of Insectology 64 (1): 119-126: 1721-8861

Medrzycki, P., Montanari, R., Borlotti, L., Sabatini, A.G., Maini, S., Porrini, Cl., 2003 : Effects of Imidacloprid administered in sublethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests, Bulletin of Insectology 56, 59 – 62

Mohr S, Berghahn R, Schmiedichea R, Hübnera V, Lotha S, Feibickea M, Mailahna W and Wogram J, 2012: Macroinvertebrate community response to repeated short-term pulses of the insecticide imidacloprid, Aquatic Toxicology 110–111: 25–36

Mommaerts V, Sterk G and & Smagghe G, 2010: Bumblebees and neonicotinoids: a bioassay to evaluate sublethal effects on foraging behavior, Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet. 21: 19-27

Nagata K, Song JH, Shono T, Narahashi T, 1998: Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. J Pharmacol Exp Ther 285:731–738.

Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U and Schmuck R, 2001b : Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). Pest Manag. Sci. 57, 577–586

Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C et al., 2009: Does Imidacloprid seed-treated maize have an impact on honeybee mortality, Entomological Society of America, April 2009,616-623

Nikolakis A, Chapple A, Friessleben R, Neumann P, Schad T, Schmuck R, Schnier HF, Schnorbach HJ, Schöning R and, Christian MausC, 2009: An effective risk management approach to prevent bee damage due to the emission of abraded seed treatment particles during sowing of seeds treated with bee toxic insecticides, Julius-KÜhn Archiv 423: 132-148

Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J and Dively G, 2012: Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema, Naturwissenschaften DOI 10.1007/s00114-011-0881-1

Ramirez-Romero R, Chaufaux J and Pham-Délègue MH, 2005: Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee Apis mellifera, a comparative approach, Apidologie 36: 601–611

Ramirez-Romero R, Desneux N, Decourtye A, Chaffiol A and Pham-Delègue MH, 2008: Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? Ecotoxicol. Environ. Saf. 70: 327–333

Reetz JE, Zühlke S, Spiteller M and Wallner K, 2011: Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed-treated maize and wheat: a threat to honeybees? Apidologie 42: 596-606

Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F, 2005 : Modes of honeybees exposure to systemic insecticides : estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees, Apidologie 36 (2205), 71 – 83

Sanchez-Bayo F and Goka K, 2006 : Ecological effects of the insecticide Imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields, Environmental Toxicology and Chemistry 25 (6) : 1677-1687

Sanchez-Bayo F, 2009: From simple toxicological models to prediction of toxic effects in time, Ecotoxicology 18 : 343-354

Schmuck R, Schöring R, Stork A and Schramel O, 2001: Risk posed to Honeybees (Apis mellifera L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed-dessing of sunflowers, Pest management Sci, 57: 225-238

Schmuck R, Nauen R and Ebbinghaus-Kintscher U, 2003: Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations, Bulletin of Insectology 56 (1): 27-34

Schneider CW, Tautz J, Gruünewald B and Fuchs S, 2012: RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of Apis mellifera. PLoS ONE 7(1): e30023. doi:10.1371/journal.pone.0030023

Scott-Dupree CD, Conroy L and Harris CR, 2009: Impact of Currently Used or Potentially Useful Insecticides for Canola Agroecosystems on Bombus impatiens (Hymenoptera: Apidae), Megachile rotundata (Hymentoptera: Megachilidae), and Osmia lignaria (Hymenoptera: Megachilidae), J. Econ. Entomol. 102(1): 177-182

Seifert J & Stollber J, 2005: Antagonism of a neonicotinoid insecticide imidacloprid at neuromuscular receptors. Environ. Toxicol. Pharmacol. 20, 18–21

Smodis Skerl MI, Velikonja Bolta S, Basa Cesnik H and Gregorc A, 2009: Residues of pesticides in honeybee (Apis mellifera carnica) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards.- Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 83 (3): 374-377

Starner K et Goh KS, 2012: Detections of Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010-2011, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 88: 316-321, doi:10.1007/s00128-011-0515-5

Stein-Döneke U, Führ F, Wieneke J, Hartwig J and Leicht W, 1992: Influence of soil moisture on the formation of dressing zones and uptake of Imidacloprid after seed treatment of winter wheat, Pflanzenschutz-Nachrichten 45 (3): 327 - 367

Suchail S, Guez D and Belzunces LP, 1999: Toxicity of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*, *in* Hazards of Pesticides to bees (Belzunces LP, Pélissier C, Lewis G ed.), p 121-126, INRA Editions, Paris

Suchail S, Guez D and Belzunces LP, 2000: Characteristics of Imidacloprid toxicity in two Apis mellifera subspecies, Environmental Toxicology and Chemistry: 19(7): 1901–1905

Suchail, S., Guez, D., and 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, Debrauwer L and Belzunces, L. P., 2003: Metabolism of imidacloprid in Apis mellifera. Pest. Manag. Sci., 60: 291–296. doi: 10.1002/ps.772

Sur R and Stork A, 2003: Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants, Bulletin of Insectology 56 (1): 35-40

Tapparo A, Marton D, Giorio C, Zanella A, Solda L, Marzaro M, Vivan L and Girolami V, 2012: Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds, Environ. Sci. Technol., DOI: 10.1021/es2035152

Tasei JN, Lerin J & Ripault G, 2000: Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test, Pest Manag Sci 56: 784-788

Teeters BS, Johnson RM, Ellis MD and Siegfreid BD, 2012: Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.), Environmental Toxicology and Chemistry DOI 10.1002/etc.1830

Tennekes HA 2010: The significance of the Druckrey–Küpfmüller equation for risk assessment—The toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time, Toxicology 276: 1-4 - voir aussi les courriers liés à cette publication :

- Maus C and Nauen R, 2010: Response to the publication: Tennekes, H.A. (2010): The significance of the Druckrey–Küpfmüller equation for risk assessment—The toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time, Toxicology
- Tennekes HA, 2011: The significance of the Druckrey–Küpfmüller equation for risk assessment—The toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time: Responding to a Letter to the Editor by Drs. C. Maus and R. Nauen of Bayer Crop- Science AG, Toxicology 280 (2011) 173–175)

Tennekes HA and Sanchez-Bayo F, 2011: Time-dependent toxicity of Neonicotinoids and other toxicants: implication for a new approach to risk assessment, J Environment Ananlytic Toxicol, article on-line: http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.S4-001

Tisler T, Jemec A, Mozetic B and Trebse P, 2009: Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment, Chemosphere 76, 907–914

Tomisawa M and Casida JE, 2005: Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45: 247–268

Van Dijck T, 2010 : Effects of neonicotinoid pesticide pollution of Dutch surface water on non-target species abundance, MSc thesis, Utrecht university, 2 July 2010, updated 2 September 2010

Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B *et al.*, 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

Villa S, Vighi M, Finizio A and Bolchi Serini G, 2000: Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen, Ecotoxicology, 9: 287-297

Visser A and Blacquière T, 2010: Survival rate of honeybee (Apis mellifera) workers after exposure to sublethal concentrations of imidacloprid, Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet. 21: 29-34.

Wamhoff H and Schneider V, 1999 : Photodegradation of Imidacloprid, J. Agric. Food Chem. 47 : 1730-1734.

Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL and Goulson D, 2012: Neonicotinoid pesticide reduces Bumble bee colony growth and queen production, Science 1215025 Published online 29 March 2012

Wu JY, Smart MD, Anelli CM and Sheppard WS, 2012: Honey bees (Apis mellifera) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to Nosema (Microsporidia) infection, J. Invertebr. Pathol., doi:10.1016/j.jip.2012.01.005

Yang EC, Chuang YC, Chen YL and Chang LH, 2008: Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae), Journal of Economic Entomology 101 (6): 1743-1748

Pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides/acaricides qui tirent leur nom du pyrèthre (*Chrysanthenum cinerariaefolium* ou *C coccineum*), plante dont sont extraites les pyréthrines, substances naturelles utilisées en Chine depuis plus de 3000 ans (Kakko *et al.* 2000). Les pyréthrines ont été « copiées » pour synthétiser des substances artificielles, les pyréthrinoïdes.

Les pyréthrines ne sont pas photostables ; utilisées en traitement phytosanitaire elles sont très rapidement dégradés par les UV au champ. Les pyréthrinoïdes de seconde génération sont bien plus stables que les substances naturelles, notamment parce qu'ils comportent un radical halogéné, qui peut être chloré, fluoré ou bromé. Ils ont été introduits sur le marché à la fin des années '70 (Belzunces *et al.* 2012), après la prise de conscience des problèmes qu'entraînait la persistance des organochlorés, en particulier du DDT. Ils l'ont rapidement envahi grâce à leur toxicité sélective, moindre pour les mammifères que pour les insectes, à leur stabilité, à leur faible volatilité, à leur biodégradabilité (ils s'accumulent relativement peu dans l'environnement) et à leur efficacité (Kakko *et al.* 2003, Zhou *et al.* 2011). Celle-ci est due pour partie à l'effet dit « knock-down » qu'ils provoquent chez l'insecte, et qui met celui-ci immédiatement hors d'état de nuire[28].

Les pyréthrinoïdes sont utilisés principalement en pulvérisation et en poudrage. Ils sont considérés comme des insecticides de contact. La contamination des matrices apicoles, et du pollen en particulier, n'en est pas moins possible (voir point 5.1. ci-dessous).

Leurs effets sur les abeilles, létaux et sublétaux, ont fait l'objet d'une importante littérature, liée partiellement au soupçon que ces substances étaient la cause d'incidents dans les ruchers (voir point 1 « Le contexte… » de l'introduction de ce rapport). Ils méritent d'être étudiés en détail, car leur usage tant en biocides qu'en produits phytosanitaires est très large, aussi bien au niveau des pestes combattues et des milieux ou cultures traitées, que sur le plan des époques de traitement - l'usage phytosanitaire de certains d'entre eux est actuellement autorisé en pleine floraison sur certaines cultures (par exemple Nexide® (γ-cyalothrine), Decis EC 2,5® (Deltaméthrine) ; Karate-Zéon® (λ-cyalothrine)). Ils ont par ailleurs été, et sont toujours soupçonnés de causer l'affaiblissement des ruches par disparition des butineuses, notamment par des apiculteurs qui constatent l'affaiblissement de ruches en saison en l'absence d'abeilles mortes devant les ruches, car les abeilles intoxiquées aux pyréthrinoïdes meurent principalement hors de la ruche contrairement à ce qui se passe lors des intoxications par les carbamates et les organophosphorés (Cox & Wilson 1984 ; Vandame & Belzunces 1995).

1. Nature et mécanisme d'action

Chimiquement parlant, les pyréthrinoïdes sont des esters (c'est à dire qu'ils sont issus de l'estérification d'un acide organique par un alcool), ce qui explique que ce soient des substances lipophiles (Log Pow[29] : cyperméthrine, 5,3 à 5,6 ; deltaméthrine, 4,6). Ce caractère lipophile contribue à leur toxicité car il leur permet de se lier aux protéines membranaires sur lesquelles ils agissent. Ils sont faiblement volatils, au contraire d'autres esters.

On distingue des pyréthrinoïdes de type I et II ; les « type II » se distinguent par le fait que, outre le (ou les) halogènes, la molécule porte un groupement cyano (-CN). Par exemple, la perméthrine est un pyréthrinoïde de type I, la deltaméthrine et la cyperméthrine sont des pyréthrinoïdes de type II – la cyperméthrine est en fait une molécule totalement similaire à la perméthrine, à ceci près qu'elle est cyano-substituée.

[28] Source : rubrique « Pyrethroids » dans la version anglaise de Wikipedia.
[29] Le Log Pow est le logarithme du coefficient de répartition de la substance entre l'eau et l'octanol. Plus il est élevé plus la substance est lipophile ; plus il est bas plus la substance est hydrophile.

L'alpha-cyperméthrine est l'un des isomères, le plus toxique, de la cyperméthrine ; celle-ci en contient typiquement 20 à 40%[30].

Sur le plan toxicologique, les pyréthrinoïdes sont des neurotoxiques et leur effet insecticide procède de cette neurotoxicité. Leur première cible est le canal Na^+ voltage-dépendant de la membrane des neurones[31], dont ils modifient les cinétiques d'ouverture et de fermeture ; leur principal effet est de prolonger artificiellement l'ouverture de ces canaux sodium (revu par Belzunces *et al.* 2912). Il s'ensuit une perméabilité accrue de la membrane neuronale, dont la conséquence le plus souvent décrite est un abaissement du seuil d'excitabilité du neurone. L'hyper excitabilité neuronale explique certains symptômes de l'empoisonnement par les pyréthrinoïdes chez les mammifères, tels que tremblements et convulsions[32]. Chez les mammifères toujours, les pyréthrinoïdes ont des effets sur le système nerveux central, qui se traduisent notamment par une activité cérébrale de type épileptique et par des anomalies comportementales ; par ailleurs ce sont des allergènes qui sont susceptibles de provoquer des maladies auto-immunes (Kakko *et al.* 2003). Chez l'abeille en revanche, une élévation du seuil d'excitabilité a été montrée dans les neurones cérébraux par exposition à trois pyréthrinoïdes, la bifenthrine, la deltaméthrine et le fluvalinate (Zhou *et al.* 2011).

En outre, les pyréthrinoïdes bloquent les récepteurs du GABA et du glutamate dont le rôle inhibiteur se trouve compromis, ce qui accentue encore l'hyperexcitabilité neuronale (Badiou *et al.* 2008, Schleier 2011). Ils agissent sur l'acétylcholinestérase (AChE), un effet qui a été investigué chez l'abeille (Badiou *et al.* 2008). Ils influent enfin sur l'activité des ATPases qui, fixées sur la membrane neuronale, jouent également un rôle important dans le transfert d'ions Na^+, K^+ et Mg^{2+} (Kakko *et al.* 2003). A propos de cette action sur les ATPases, on relèvera que la courbe dose-réponse de l'effet de la cyperméthrine et de la perméthrine sur les ATPases Mg2+ présente un caractère multiphase, les substances provoquant une activation de ces ATPases à certaines doses (10 à 50 μM) et une inhibition des mêmes aux fortes doses (100 μM) ; le phénomène des courbes dose-réponse multiphase, que nous avons vu à propos de l'imidaclopride, n'est donc pas limité à celui-ci.

La toxicité des pyréthrinoïdes est sélective : les insectes détoxifient relativement moins bien ces molécules que les mammifères, et y sont de surcroît intrinsèquement plus sensibles. En outre, cette toxicité s'accroît lorsque la température s'abaisse (Blum and Kearns 1956 *in* Cox & Wilson 1984); or la température interne des mammifères est généralement supérieure à celle des insectes. Toutes ces différences, mises ensembles, conduisent à une différence importante de toxicité entre insectes et mammifères : les pyréthrinoïdes sont globalement 15 000 fois plus toxiques pour les premiers que pour les seconds (Narahashi 2007). La fluctuation de la toxicité avec la température laisse par ailleurs à penser que les pyréthrinoïdes sont plus toxiques par temps froid que par temps chaud. Enfin, la variation inverse de la toxicité avec la température pourrait entrainer un effet en boule de neige, dans la mesure où certaines intoxications entrainent l'hypothermie chez l'insecte, un effet qui a été montré avec le diméthoate et, chez l'abeille, avec la deltaméthrine (Vandame & Belzunces 1998).

Les pyréthrinoïdes sont fortement synergisés par les fongicides azoles et par le pipéronyl butoxide (PBO), tant parce qu'ils ont des cibles communes (les ATPases) que parce que ces substances (azoles et PBO) sont des inhibiteurs du cytochrome P450, une enzyme qui joue

---

[30] source : Inchem : http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v53je05.htm

[31] Pour rappel, l'influx nerveux consiste en une rapide dépolarisation de la membrane du neurone, qui est usuellement polarisée (c'est le potentiel de repos) et peut être dépolarisée par un stimulus ou par un influx venu d'un autre neurone qui provoquent l'ouverture de canaux ioniques voltage-dépendants. le sodium Na^+ et le potassium K^+ sont deux des principaux ions impliqués dans ce mécanisme, le principal ion négatif étant le chlorure Cl^-.

[32] Voir l'article des « Folia veterinaria » sur les effets des intoxications chez les mammifères ; disponible sur le Net : http://www.bcfi-vet.be/fr/frinfos/frfolia/03FVF3b.pdf, consultation 20-08-2012.

un rôle important dans la détoxification de nombreuses substances endogènes et exogènes à l'organisme, et notamment des pyréthrinoïdes[33] (Kakko *et al*. 2000, Kakko *et al*. 2003).

Les pyréthrinoïdes sont réputés avoir un effet répulsif sur l'abeille. Cet effet est supposé protéger les abeilles dans la mesure où un tel effet contribuerait à écarter celle-ci des cultures traitées, et où ces substances sont peu persistantes sur les plantes. Ce n'est pas réellement le cas, comme on le verra car ce point est discuté amplement ci-dessous (voir point 6.1.)

2. Principaux métabolites

L'acide décaméthrinique est le seul métabolite majeur de la deltaméthrine dans le sol (Review Report p. 12) ; il est considéré comme pertinent du point de vue environnemental[34]; sa DT_{50} typique est de 2 ,3 jours (Footprint 2012).
L'acide 3-phénoxybenzoïque est quant à lui un métabolite commun à plusieurs pyréthrinoïdes : cyperméthrine, deltaméthrine, α-cyperméthrine, ζ-cyperméthrine, γ-cyalothrine, λ-cyalothrine). Pour la cyperméthrine, il est le seul métabolite retrouvé dans les sols et en quantité significative ; c'est un métabolite majeur dans l'eau. Sa DT_{50} typique est de 4,3 jours. Ce métabolite n'est pas considéré comme pertinent du point de vue environnemental (Footprint 2012).

3. Devenir et comportement dans l'environnement

Les pyréthrines naturelles sont photolabiles ; les pyréthrinoïdes de synthèse ont été conçus pour résister davantage à la décomposition par les UV de la lumière : leur délai de décomposition « se compte en jours et non plus en heures » selon le chercheur qui les a mis au point (*in* Demoute 1989). Ils sont donc en général faiblement persistants.

Les pyréthrinoïdes sont lipophiles, et sont fortement adsorbés par la matière organique (Katagi 2010, publication relative aux organismes aquatiques). En conséquence, dans les systèmes eau/sédiments, ils ont tendance à s'accumuler dans ces derniers[35].

Les organismes vivant dans le sol ou dans les sédiments son donc susceptibles d'y être fortement exposés.

Le caractère lipophile va usuellement de pair avec la faculté de bioaccumulation de la substance dans les organismes vivants. Toutefois, la bioaccumulation des pyréthrinoïdes est moindre que ce que l'on peut en attendre au vu de leur log Pow, ce qui est probablement dû au fait que dans les organismes ils sont hydroxylés en acides et alcools, dont le caractère est hydrophile (*ibid*.). Ils n'en sont pas moins significativement accumulés par les tissus des plantes (Erstfeld 1999), ce qui vraisemblablement explique leur présence dans le pollen plusieurs jours après l'application, comme on le verra ci-dessous.

---

[33] Ce qu'on appelle usuellement le cytochrome P450 est en fait une superfamille d'enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation de substances organiques. La réaction la plus fréquemment catalysée est l'oxydation de la substance par un atome unique d'oxygène ; la monooxygénase à cytochrome P450 dont il sera question dans la suite de ce rapport, est le système enzymatique qui intervient dans ce type de réaction.

[34] En vertu de la législation relative aux pesticides (directive 91/414.CEE, règlement (CE)1107/2009), un métabolite est dit pertinent si :

- il y a des raisons de penser qu'il a des propriétés intrinsèques comparables à celles du composé parent en terme d'activité biologique sur la cible, ou
- il a des propriétés toxicologiques considérées comme sévères, ou
- il pose pour les organismes un risque comparable ou plus élevé que le composé parent.

[35] voir notamment la page qui leur est consacrée sur le site de l'EPA (Environmental Protection Agency, USA) : http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html

3.1. Dans les sols

Dans l'ensemble les pyréthrinoïdes ne sont pas des molécules persistantes : leur persistance est faible à modérée. Ces substances sont aisément dégradées dans le sol par les microorganismes. La principale voie de dégradation est la rupture du lien ester, restituant l'acide et l'alcool, qui sont ultérieurement oxydés en CO_2. Toutefois une partie des résidus se lie au sol et est non extractibles ; l' oxydation finale de ces composés en CO_2 est lente (Demoute 1989).

La cyperméthrine est modérément persistante avec une DT_{50} typique de 60 jours, une DT_{50} (20°C, labo) de 64 jours et une DT_{90} de 273 jours (20°C, labo) et 126 jours (champ) (Footprint 2012) – pour la DT_{90} labo, le Review Report donne 191 et 354 jours pour les isomères trans- et cis- respectivement (SanCo 2005).

La deltaméthrine est considérée comme non persistante, avec une DT_{50} (labo, 20°C) de 26 jours, une DT_{50} au champ de 21 jours et une DT_{90} (20°C, labo) de 87 jours (DT_{90} au champ : 60 jours) (Footprint 2012, même DT_{50} dans « Review Report » européen (SanCo 2002)).

La perméthrine est non persistante. Sa DT_{50} (20°C, labo) est de 13 jours (DT_{50} typique : 13 jours, sa DT_{90} au champ est de 42 jours.

La bifenthrine est non persistante pour la DT_{50} typique qui est de 26 jours (DT_{50} au labo à 20°C : 102,2 jours ; la DT_{90} (20°C, labo) est de 346 jours, la DT_{90} au champ de 3410,8 jours. L'un de ses métabolites est l'acide TFP ((1RS,3RS)-3-((Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid), contaminant potentiel des eaux souterraines (Footprint 2012)

3.2. Dans l'eau

La deltaméthrine a une DT_{50} dans l'eau de 17 heures, dans le système eau/sédiment de 40 à 90 jours (DT_{90} de 130 à 290 jours) (SanCo 2002)

La cyperméthrine a une DT_{50} dans l'eau de 3 jours ; dans le système eau-sédiment la DT_{50} est de 17 jours (DT_{90} : 92 jours) (SanCo 2005)

3.3. Dans l'air

Les pyréthrinoïdes sont de manière générale peu volatils. Les chiffres suivants en témoignent :

- Deltaméthrine : pression de vapeur : 1,24 10^{-8} Pa à 25°C, DT_{50} dans l'air (dégradation photochimique) de 16 heures (SanCo 2002)
- Cyperméthrine : pression de vapeur : 2,3 10^{-7} Pa à 20°C (SanCo 2005)

3.4. Dans les organismes vivants

3.4.1. Animaux

La métabolisation des pyréthrinoïdes dans les vertébrés est relativement rapide : quelques jours au plus. La dégradation par l'organisme animal passe par la rupture du lien ester ; on retrouve donc un acide organique et un alcool. Les acides et alcools, qui peuvent subir à leur tour différentes réactions de dégradation, sont hydrophiles et facilement éliminés par l'organisme, ce qui contribue à l'élimination rapide des pyréthrinoïdes.

La dégradation est toutefois beaucoup moins rapide chez les poissons qui détoxifient beaucoup moins bien ce type de molécules (Demoute 1989). La toxicité pour ceux-ci est en conséquence très élevée (ex.: deltaméthrine : CL_{50} aiguë = 0,26μgL^{-1}, CL_{50} chronique < 0,03 μgL^{-1}) ce qui participe au danger que ces molécules représentent pour le milieu aquatique

(les CL_{50} sont très basses aussi pour d'autres organismes que les poissons : 0,0041 μgL^{-1} pour la Daphnie en test chronique !).

Chez l'abeille, une étude relative à la métabolisation de la cyfluthrine, de la λ-cyalothrine et du τ-fluvalinate montre que la métabolisation des pyréthrinoïdes se fait grâce aux monooxygénases à cytochrome P450 et aux carboxylestérases principalement ; les glutathion-S-trnasférases ne joueraient qu'un rôle accessoire. Les monooxygénases hydroxylent la partie alcool, une action qui est appuyée par les carboxylestérases qui catalysent la rupture du lien ester (Johnson *et al.* 2006).

Dans l'abeille toujours la deltaméthrine libre décroît très rapidement après l'exposition : même immédiatement après l'exposition, le taux de recouvrement ne dépasse pas 38% et après 3 heures, il est d'une vingtaine de % chez des abeilles exposées à 7,5 ou 10 ng, et n'est plus détecté chez de abeilles intoxiquées à hauteur de 2,5ng/ab (Vandame & Belzunces 1995).

3.4.2. Plantes

Deux voies de dégradation sont à envisager dès lors que le produit est appliqué en pulvérisation : la dégradation en surface, et la métabolisation dans la plante. En surface, les réactions de dégradation sont proches de celles issues de la photodégradation ; dans la plante, les réactions de catabolisation sont largement similaires à celles rencontrées chez l'animal (Demoute 1989).

Bos et Masson obtiennent, le jour de la pulvérisation (sur colza), 6 mg/kg de feuille ; ils calculent que cela représente environ 3g de résidus par hectare traité pour la dose appliquée (8,5 g/ha). Sur fleurs la deltaméthrine disparaît rapidement par extension florale et par photolyse (Holmstead *et al.* 1978 *in* Bos & Masson 1983).

Toutefois dans l'étude de Bos et Masson, le pollen de trappe est apparu contaminé aux jours J + 4 et J + 8, à hauteur de 20 ppb.

4. Systémicité

La translocation des pyréthrinoïdes dans la plante n'a jamais été détectée selon Demoute 1989. Toutefois, certaines substances sont susceptibles d'être absorbées à partir de l'air et de se concentrer dans la biomasse : le coefficient de partition octanol-air (Koa) de la substance est considéré comme un indicateur de ce potentiel d'accumulation et en conséquence comme un indicateur de la capacité de reprise de la substance dans le pollen (Villa *et al.* 2000).

Nous n'avons pas trouvé de publication établissant les Koa des pyréthrinoïdes ; toutefois, si l'on suit les équations de Villa *et al.*, les pyréthrinoïdes ont vraisemblablement un Koa élevé, vu leur Kow élevé et leur faible tension de vapeur. Leur présence dans le pollen est donc théoriquement vraisemblable.

5. Exposition de l'abeille

C'est par contact que l'abeille est principalement exposée : soit par contact direct (par exemple lorsqu'elle est touchée par une pulvérisation alors qu'elle est en vol ou occupée à butiner) soit par contact indirect, notamment par le contact des pattes avec les résidus présents sur la végétation après pulvérisation ; dans certains essais (Taylor *et al.* 1987 et Rieth 1986 notamment), les abeilles sont mises en contact avec le pesticide par le biais d'un papier filtre imprégné sur lequel on les a posées en boîtes de Petri, ou qu'on a placé sur le nourrisseur, respectivement ; dans les études citées ce contact a provoqué des effets sublétaux.

L'abeille peut également entrer en contact avec les pyréthrinoïdes par le biais de la contamination des cires, ce qui vaut d'être noté dans la mesure où un pyréthrinoïde, le fluvalinate, est utilisé comme moyen de lutte contre la varroose.

Enfin, elle peut également absorber du pollen contaminé et transmettre cette contamination à ses larves, une voie d'exposition qui n'est pas improbable car les pyréthrinoïdes sont parfois détectés dans le pollen comme on le verra au point 5.1. ci-dessous.

5.1. Présence dans les matrices apicoles

Une large étude de monitoring a été menée en France entre 2002 et 2005 sur 120 colonies (5 colonies prises au hasard dans 5 ruchers de chacune de 5 régions de France (Eure, Yonne, Indre, Gers et Gard – un rucher a fait défection) ; des échantillons d'abeilles, de cire, de pollen et de nectar ont été prélevés dans chacune de ces ruches et ont fait l'objet d'analyses chimiques pour la recherche de 44 pesticides différents. Parmi les molécules recherchées figuraient 4 pyréthrinoïdes : la cyfluthrine, la cyperméthrine, la deltaméthrine et la λ-cyalothrine. Les deux premières substances ne sont présentes que dans les cires, mais elles y sont largement représentées, contaminant 9,3 et 16,1% des échantillons respectivement. La deltaméthrine contamine 5,9% des échantillons d'abeilles (teneur moyenne 16,9 ppb), 0,5% des échantillons de pollen (teneur moyenne 39 ppb), 0,8% des échantillons de miel (teneur moyenne 2,6 ppb) et 1,1% des échantillons de cire (teneur moyenne 14,7 ppb). La λ-cyalothrine n'est détectée que dans les abeilles (1,3% des échantillons, 18,6 ppb de contenu moyen) (Chauzat *et al.* 2011).

Tasei *et al.* citent un taux de contamination du pollen par la deltaméthrine de 10 ppb (Tasei *et al.* 1988).

Aux Etats-Unis, une étude a été menée en 2007 sur 108 échantillons de pollen (pain d'abeille et pollen de trappe). Elle a révélé la présence de 46 pesticides différents, dont 26 sont des insecticides. Parmi ceux-ci, 8 sont des pyréthrinoïdes. Le fluvalinate est le plus fréquent, mais parmi les pesticides dont la présence est significative figurent également la cyalothrine, la fenpropathrine et l'esfenvalérate (Frazier *et al.* 2008). Cette étude a été ultérieurement poursuivie et étendue jusqu'à inclure 320 échantillons de pain d'abeille, et 28 de pollen de trappe. La cyalothrine est présente cette fois dans 10% des échantillons de pollen, la cyperméthrine dans 7,1% d'entre eux, la cyfluthrine dans 6,9%, la deltaméthrine dans 3,1%, la perméthrine dans 2,6%, l'allethrine dans 1%. Ces substances sont également présentes dans les cires (Cyperméthrine et cyalothrine : 5%, cyfluthrine 4,3%, deltaméthrine 3,1%, perméthrine 1,9%, allethrine 3,8%). Les niveaux de contamination sont souvent faibles mais les niveaux les plus élevés sont importants (dans le pollen : cyperméthrine 26 ppb, cyalothrine 2 ppb, cyfluthrine 34 ppb, deltaméthrine 91 ppb, perméthrine 92 ppb, allethrine 11 ppb. Dans les cires la teneur en deltaméthrine atteint 613 ppb ! (Mullin *et al.* 2010).

Malgré leur emploi ponctuel et leur faible persistance, ces substances sont donc bien transportées par les abeilles dans les ruches et les matrices apicoles sont alors contaminées.

6. Toxicité pour les abeilles

Contrairement aux néonicotinoïdes, les pyréthrinoïdes sont beaucoup plus toxiques par contact que par voie orale. C'est aussi par contact que l'exposition de l'abeille est réputée avoir principalement lieu ; encore que, au vu de la contamination de matrices comme le pollen, il conviendrait d'examiner de plus près les toxicités orales à long terme de ces molécules.

Les pyréthrinoïdes comptent dans leurs rangs certains des composés les plus toxiques qui soient pour l'abeille (la cyfluthrine a une DL_{50} de 1 ng/abeille). Ils ont la réputation de

tuer au champ (sources : J. Schiro, exposé à la journée scientifique de l'AFSSA du 10 septembre 2002) : les abeilles sous l'effet knock-down, iraient se poser sur la végétation proche où elles la mort les saisit (L. Belzunces, communication personnelle ; Cox et Wilson 1984). Cette mortalité concerne les butineuses, et selon les apiculteurs, l'intoxication massive par les pyréthrinoïdes utilisés en phytopharmacie se traduirait par une chute rapide du nombre d'abeilles présentes dans les hausses.

Certains pyréthrinoïdes n'en sont pas moins utilisés en médication apicole. C'est le cas du τ-fluvalinate et de la fluméthrine, deux substances utilisées dans la lutte contre la varroose et formulées pour l'utilisation dans les ruches (Apistan® et Bayvarol®, respectivement). Ces deux substances se distinguent des autres pyréthrinoïdes par la présence d'un cycle sur la partie acide (les autres n'ont de cycles que sur la partie alcool) ; ce cycle supplémentaire jouerait un rôle sur la facilité avec laquelle la molécule se lie aux monooxygénases du cytochrome P450, ce qui expliqueraient qu'elles sont plus facilement détoxifiées par l'abeille (Johnson *et al.* 2006) ; toutefois, comme on le verra ci-dessous, la fluméthrine est très toxique pour l'abeille comme pour le Varroa (Perez-Santiago *et al.* 2000), ce qui pose question quant à l'hypothèse de Johnson *et al.*.

6.1. Effets répulsif

L'effet répulsif des pyréthrinoïdes a fait l'objet de plusieurs études et les opinions à ce propos varient. Comme dit plus haut, l'hypothèse a été faite, que la répulsivité de ces produits a pour effet de protéger l'abeille des effets de la contamination, à tel titre que Atkins a proposé d'ajouter de la perméthrine aux insecticides à haut risque pour l'abeille afin de réduire ce risque (Atkins 1981 *in* Rieth 1986). Il est donc fondamental de comprendre la nature du phénomène concerné.

De nombreuses études il apparaît clairement que la pulvérisation d'une culture en fleurs avec un pyréthrinoïde a pour conséquence l'arrêt du butinage (Taylor *et al.* 1987) ; notamment Boquet *et al.* 1982, *in* Ramirez-Romero 2005, note une chute du butinage après traitement au Décis à 7,5 g s.a./h). La cause de cet arrêt, dû soit à un effet répulsif de la substance, soit à ses effets létaux ou sublétaux sur l'abeille, a fait l'objet de controverses (Vandame *et al.* 1995). Celles-ci ne sont d'ailleurs pas propres au pyréthrinoïdes ; pour les insecticides organophosphorés aussi, l'arrêt du butinage suite à la pulvérisation est également un phénomène bien connu, qui fut tout d'abord imputé à la répulsivité du produit avant qu'il ait été montré en laboratoire que celle-ci n'existe qu'à des doses bien supérieures à celles utilisées au champ. En fait, les organophosphorés produisent une perte immédiate de vitalité de l'abeille qui se traduit par une importante mortalité différée (revu par Belzunces *et al.* 2012). La question se posait donc aussi pour les pyréthrinoïdes, question qui n'est pas anecdotique car selon que l'on suit l'une ou l'autre thèse, on considérera que le risque d'application de telles substances sur une culture est faible ou important, respectivement.

Taylor *et al.*, qui ont testé l'effet par contact de 6 pyréthrinoïdes sur l'abeille (dont la cyperméthrine), font l'hypothèse que l'arrêt du butinage est lié à la disruption des facultés olfactives de l'abeille (voir point 6.4.3. ci-dessous), une hypothèse dont on relèvera par ailleurs qu'elle n'est pas incompatible avec l'existence d'une répulsivité chez l'abeille (Taylor *et al.* 1987).

Bos et Masson ont conduit une série d'études (champ, serre et labo) pour évaluer l'effet répulsif du Décis, préparation à base de deltaméthrine. Si l'essai au champ ne permet guère l'interprétation, l'essai en laboratoire montre clairement que les abeilles discriminent une coupelle de sirop selon que celui-ci est ou non contaminé avec la préparation Decis (25 μg/mL ≈ 18 ppm) ; mais elles ne discriminent pas une coupelle normale d'une coupelle contaminée à la deltaméthrine non formulée. Cet effet répulsif de la préparation est encore accentué lorsqu'au sirop est ajoutée une odeur florale (le géraniol dans cet essai). Cette étude ne démontre donc pas l'effet répulsif de la

deltaméthrine non formulée (Bos & Masson 1983). Les mêmes résultats apparaissent dans une étude ultérieure où des abeilles ont été entraînées à fréquenter un nourrisseur contenant une odeur (géraniol à nouveau) : le caractère attractif de l'odeur est dépassé par le caractère répulsif du Cymbush® et cette étude ci aussi montre que l'effet répulsif, qui dure 2 jours, est lié à la formulation et non à la cyperméthrine (Delabie *et al.* 1985). Toutefois, Ramirez-Romero *et al.* ont constaté que la deltaméthrine à 0,5 ppm diminue significativement la consommation de sirop par rapport au témoin (Ramirez-Romero *et al.* 2005) – par rapport à la dose létale 50 : l'abeille qui ingurgiterait 40 μL de sirop à 0,5 ppm (soit 500 μg/kg soit encore 650 μg/L) ingérerait 26 ng de la substance, alors que la DL_{50} orale est de 79 ng/abeille.

Mais les précédentes études ont été faites en considérant la répulsivité par voie orale. Or le mécanisme d'intoxication implique vraisemblablement essentiellement la voie topique. D'autres études ont testé cette voie. Karise *et al.* ont fait l'essai sur des plots de colza ; dans ces conditions la pulvérisation d'α-cyperméthrine, même répétée, n'a aucun effet de répulsivité sur l'abeille. Le nombre d'abeilles butinant par surface de champ n'est pas influencé par le traitement, mais l'est en revanche largement par le nombre de fleurs écloses dans la culture (Karise *et al.* 2007).

Mais l'étude la plus décisive et la plus complète est sans doute celle de Rieth. Ce chercheur a testé systématiquement la répulsivité par contact de la perméthrine, de la cyperméthrine et d'autres pesticides (dont le méthyl-parathion). Les pesticides sont appliqués sur un papier filtre sur lequel l'abeille doit se déplacer pour aller au nourrisseur. Les abeilles diminuent fortement la fréquentation du nourrisseur dès que les doses appliquées dépassent le mg et l'effet est dose-dépendant (la fréquentation diminue du tiers à 1 mg, de la moitié à 10 mg, pour la cyperméthrine par exemple). On relèvera que 1 mg représentent environ 10 mg/cm^2 ce qui représente 4 à 8 fois la dose d'application (à celle-ci il n'y a donc pas de répulsivité).

Un autre constat intéressant de cette étude, est que les abeilles continuent de fréquenter le nourrisseur si elles sont séparées du papier-filtre par un écran perméable aux odeurs. Ce n'est donc pas l'odeur qui induit l'effet répulsif, contrairement à l'hypothèse de Taylor. En outre, des abeilles dont l'abdomen a été touché par une dose minimale de perméthrine (3,8ng) cessent également pour la plupart de fréquenter le nourrisseur (non contaminé pour cet essai). Après contact avec le produit, les abeilles montrent des symptômes d'intoxication : elles apparaissent désorientées, ont des comportements de nettoyage exagérés etc. Cet effet dure 24 heures et si le nourrisseur n'est plus contaminé, les abeilles y retournent le jour suivant ; l'effet n'est donc pas létal et il y a récupération, un résultat qui est confirmé par d'autres études notamment Decourtye *et al.* 2004 (voir point 6.4.3. ci-dessous).

La conclusion de Rieth est donc que cet effet, qu'il continue à appelé répulsivité, est dû non au fait que l'insecte serait « repoussé » et s'abstiendrait en conséquence d'entrer en contact avec la substance, mais bien au fait que, après contact avec la substance, l'abeille est « sonnée » sur le coup, sans que l'intoxication soit suivie de mortalité, un effet que l'auteur rapproche de l'effet knock-down bien connu par ailleurs.

Sur le plan conceptuel, la situation est donc fondamentalement différente de la répulsivité au sens usuel du terme, en ce sens que l'effet, s'il écarte momentanément l'abeille de la culture traitée, ne lui évite nullement l'intoxication : c'est au contraire cette dernière qui provoque l'effet. En témoigne encore que Rieth, qui a testé l'hypothèse d'Atkins en soumettant les abeilles au mélange parathion-méthyl - perméthrine, montre que l'effet toxique serait additif, et non pas un effet de protection, grâce à la perméthrine, des dangers du parathion-méthyl (Rieth 1986). Par rapport à cette étude de Rieth on relèvera encore que, si dans l'essai les abeilles sont retournées à la ruche qui était très proche (quelques mètre : l'étude est faite sous tunnel et sous cage de vol), on peut se demander

ce qu'il en est de cet effet lorsqu'il surprend l'abeille à plusieurs centaines de mètres de sa ruche…

En outre encore, selon Belzunces *et al.*, la durée de l'effet, qui est de 24 heures environ, n'est pas suffisant pour éviter à l'abeille la toxicité résiduelle de contact (revu par Belzunces *et al.* 2012).

On ajoutera enfin que cet effet répulsif sans létalité constatée, ne vaut évidemment que pour les doses sublétales ; il joue lorsque l'exposition se fait par le contact de l'abeille avec la fleur traitée, mais pas lorsqu'elle se fait par contact direct de l'abeille avec le produit. L'abeille prise elle-même dans la dérive ou dans la pulvérisation a toutes les chances d'être couverte par une dose létale et de ne pas en réchapper. Prenons un exemple : si sa surface d'exposition est de 0,5 cm^2, une pulvérisation à raison de 5g de deltaméthrine par ha la mettrait en contact avec 25 ng de substance, soit plus de 10 fois la DL_{50} puisque celle-ci est de 1,5 ng/abeille. Dans l'étude de Rieth le papier filtre contient aussi des doses importantes de perméthrine (10 000 DL_{50}/cm^2 selon le calcul des auteurs) ; mais l'abeille n'est en contact avec ce papier que par le bout des tarses, une situation qui n'est pas comparable à celle d'une abeille traversant un nuage de pulvérisation (réflexion personnelle). Une étude relative à l'effet d'une pulvérisation, en serre et en champ, de Cymbush® (50g de cyperméthrine/ha) montre l'apparition d'une mortalité anormale pendant les 3 jours suivant le traitement (la mortalité dans les trappes Todd[36] passe de 50 à 200 abeilles par jour ; la mortalité en dehors des trappes n'est malheureusement pas mesurée) (Delabie *et al.* 1985).

On ne peut donc conclure que la répulsivité des produits et substances protège l'abeille des pyréthrinoïdes, et des mesures spécifiques doivent être prises pour éviter tout contact de l'abeille avec ceux-ci, vu la toxicité de ces produits pour l'abeille, point qui est détaillée ci-dessous.

6.2. Toxicité létale par exposition aiguë

La toxicité aiguë létale des pyréthrinoïdes pour l'abeille est très variable : certains de ces composés ont une DL_{50} très basse et en conséquence une toxicité élevée (cyperméthrine 20 ng/ab ; deltaméthrine 1,5 ng/ab ; bifenthrine : 100 ng/ab; perméthrine : 29 ng/ab, la cyfluthrine, avec une DL_{50} de 1ng/ab, est l'un des composés les plus toxiques qui soient par exposition aiguë de l'abeille) (Footprint 2012) – chiffres données pour la DL_{50} de contact). En revanche, le τ-fluvalinate a une DL_{50} bien plus élevée (DL_{50} de 12 000 ng/ab), ce qui a permis l'usage de cette molécule dans la lutte contre l'acarien *Varroa destructor*. La fluméthrine, un autre pyréthrinoïde utilisé en acaricide dans les ruches, a quant à lui une DL_{50} bien plus basse (50 ng/abeille) (Perez-Santiago *et al.* 2000) mais le rapport important entre cette DL_{50} et celle du varroa en a fait également un acaricide utilisé dans les ruches en usage vétérinaire (Bayvarol® en Europe).

La toxicité par exposition orale est généralement plus faible : pour la deltaméthrine elle est de 79 ng/abeille, celle de la cyperméthrine est de 35 ng/abeille. Au champ, la NOAEL de la deltaméthrine est évaluée à 6,5 g/ha selon le dossier européen (SanCo 2002 et 2005).

La toxicité varie toutefois avec l'âge des abeilles par exemple, pour la cyperméthrine, la DL_{50} est 1,8 fois plus grande pour les abeilles de 2-6 jours que celles de 12-18 jours (Delabie et al. 1985). Elle varie également avec la température : de 10 à 20 ng/ab à 12-20°C, elle passe à 20-30 ng à 32°C (*ibid.*).

Toutefois, avec les pyréthrinoïdes, l'estimation de la mortalité au champ pose le problème que les abeilles meurent vraisemblablement hors de la ruche. Cox et Wilson ont traité des

[36] Les trappes Todd sont des trappes à abeilles mortes posées devant les ruches. Le nombre d'abeilles qu'on y trouve est considéré comme reflétant la mortalité naturelle de la ruche, car si la plupart des abeilles meurent naturellement au champ, une certaine proportion d'entre elles meurent dans la ruche et sont évacuées par des consœurs.

abeilles à la perméthrine par contact avec 9 ng/ab, une dose qui n'engendrait pas de mortalité supérieure à celle du contrôle dans les tests de mortalité. Ils ont constaté que les abeilles traitées, malgré le caractère non létal de la dose, ne retournaient pas à la ruche. Ces abeilles désorientées ont été retrouvées sur le sol du tunnel d'essai et mises en cages ; une partie des cages a été mise en laboratoire à une température équivalente à celle du nid et l'autre partie a été conservée dans le tunnel, à la température de celui-ci donc. Dans le premier cas les abeilles ont survécu et dans le second cas 90% d'entre elles sont mortes. Les auteurs pensent que les abeilles conservées en tunnel ont été victimes d'une intoxication plus sévère par le fait que les pyréthrinoïdes sont plus toxiques à température basse qu'à température élevée. Ils relèvent que dans un tel cas de figure, de nombreuses abeilles peuvent mourir sans que la mortalité n'apparaisse ni devant les ruches, ni dans les trappes Todd (Cox & Wilson 1984).

Bos et Masson, dans leur essai sur la répulsivité, notent qu'aucune mortalité anormale n'a été relevée lors de l'essai en champ. Les mortes en trappe montraient, entre les jours J et J + 4, une contamination s'élevant à 60 μg/kg (soit 6 ng/ab si on compte 10 000 abeilles par kg). Toutefois, la mortalité a été relevée via la pose de trappes sur les ruches et il n'est jamais dit que les mortes en champ ont été comptées ; le développement des colonies était considéré comme normal pendant tout le temps de l'observation (jusqu'à J + 32), mais le champ était sous-butiné au moment de l'application : la veille du traitement (J -1), l'intensité du butinage était nulle faute de floraison.

On relèvera enfin que la toxicité peut varier selon la race de l'abeille. Des chercheurs uruguayens ont établi la DL_{50} de plusieurs produits (dont un à base de cyperméthrine) sur l'abeille de leur région, qui est un produit de polyhybridisme : alors qu'elle est plus sensible à certains pesticides (chlorpyrifos, endosulfan), elle est relativement moins sensible au produit à base de cyperméthrine, (Cipermetrina 25 Agrin®) (Carrasco-Letelier *et al.* 2012).

6.3. Toxicité létale par exposition chronique

6.3.1. Sur l'individu

Il n'existe que très peu d'études sur la toxicité des pyréthrinoïdes par exposition chronique. Outre que ce type de test n'est pas demandé dans les dossiers d'autorisation, l'exposition des abeilles aux pyréthrinoïdes est considérée comme topique et aiguë et par conséquent la toxicité chronique n'est pas prise en compte.

Illarionov a mesuré et comparé les toxicités aiguës et chronique, par contact et par ingestion, de 11 insecticides, des pyréthrinoïdes pour la plupart (dont la deltaméthrine et la cyperméthrine) (Illarionov 1991).

Les tests par contacts ont été faits par application thoracique (exposition aiguë) ou par contact de l'insecte avec une cellophane traitée pendant 48 heures ; les tests de toxicité orale ont été faits par nourrissage à la micropipette (exposition aiguë) ou par libre accès à un nourrisseur contaminé (exposition orale). Si les chiffres ne sont pas comparables en ce qui concernent la toxicité par contact (car les unités sont différentes), en toxicité orale les doses nécessaires à tuer une abeille par exposition chronique en continu sont plus faibles que celles arrivant au même résultat par exposition aiguë[37].

La publication donne les DL_{50} aiguës et les CL_{50} chroniques par exposition continue ; en calculant la dose correspondant à la CL_{50} (sur une base de 33 μL ingérés par l'abeille) les chiffres sont comme suit, sauf erreur :

- cyperméthrine, DL_{50} aiguë = 904 ng/ab, DL_{50} chronique : 211 ng/ab

[37] Du moins si l'on se fonde sur le texte original, qui est en russe, car le texte traduit en anglais donne des unités identiques ; mais il s'agit sans doute là d'une erreur faite lors de la traduction.

- deltaméthrine, DL_{50} aiguë = 310 ng/ab, DL_{50} chronique = 102 ng/ab.

6.3.2. Sur la colonie

Bendahou *et al.* notent une mortalité importante à la semaine 20 (71%), après avoir exposé des colonies à du sirop contaminé par 12,5 μg/L de Cymbush, produit contenant 100g de cyperméthrine par litre d'éther de pétrole (1L par semaine et par colonie)[38] (Bendahou *et al.* 1999). (NB : si l'on considère que l'abeille ingère quotidiennement 33 μL de ce sirop contenant en fait 1,25 μgL^{-1} de s.a., l'abeille a été exposée journellement à 0,04 ng de substance active et à 0,4 ng de produit formulé ; or, 10 000 abeilles se répartissant 1L d sirop par semaine n'auront chacune accès qu'à 15 μL de sirop en moyenne… la dose moyenne qui a été effectivement ingérée est donc < 0,02 ng/abeille).

6.4. Effets sublétaux

Les pyréthroïdes sont connus de longue date pour produire des effets sublétaux sur l'insecte. Ces effets, sublétaux sur l'individu, sont susceptibles de provoquer la mort de la colonie (voir le point 2.2.6. de l'introduction de ce rapport); ainsi en va-t-il notamment des effets des pyréthrinoïdes sur la thermorégulation ainsi que de ceux sur la reproduction.

6.4.1. Symptômes d'empoisonnement

Dès 1984, Cox & Wilson ont décrit des comportements anormaux chez des abeilles exposées à une doses sublétale de perméthrine (1 ng/abeille): elles commencent par montrer des comportements de nettoyage exagéré puis l'abdomen se contracte et elles commencent à tourner sur elles-mêmes ou à exécuter des danses tremblantes. Pendant ce temps les abeilles ne travaillent évidemment pas et leurs tâches restent en suspens (Cox & Wilson 1984). Rieth observe également des comportements de nettoyage exagérés qui pourraient être dus au caractère irritant de ces substances, ainsi qu'une relative inactivité ; il observe que les abeilles intoxiquées n'attirent pas l'attention des autres abeilles, au contraire de ce qui se passe avec le parathion-méthyl, qui de ce fait a pour effet de faire cesser la fréquentation non seulement du nourrisseur contaminé, mais aussi du nourrisseur de contrôle car les abeilles non contaminées sont perturbées par les abeilles contaminées. Dans le cas des pyréthrinoïdes le nourrisseur de contrôle est toujours fréquenté car les abeilles contaminées sont plutôt anormalement calmes et ne perturbent donc pas le travail des abeilles non contaminées (Rieth 1986).

6.4.2. Effets sur la longévité

Une étude propose un modèle statistique permettant d'évaluer l'effet d'un contaminant sur la durée de vie (Dechaume-Montcharmont *et al.* 2003). Ce modèle a été appliqué à une expérimentation où des abeilles en cagettes (cagettes Pain, 50 abeilles) ont été élevées en utilisant dès le second jour des sirops contaminés à l'imidaclopride (4 et 8 ppb) et à la deltaméthrine (15 et 30 ppb). L'étude montre un raccourcissement significatif de la durée de vie dans les deux cas. S'agissant de la deltaméthrine, la mortalité s'élève anormalement par rapport au contrôle dès 20 jours et atteint les 100% vers 45 jours (cette montée est relativement plus progressive qu'avec l'imidaclopride) : la durée de vie est réduite de 15 jours environ pour 40% de abeilles. Ces résultats sont d'une importance fondamentale en regard de l'importance de la durée de vie de l'abeille pour la survie de la colonie (voir point 2.2. de la partie relative à l'abeille dans l'introduction à ce rapport). Enfin, on notera que l'effet dose-réponse est inverse comme pour l'imidaclopride : la concentration la plus basse menant aux plus fortes mortalités sur la plus grande partie des courbes mortalité/temps.

[38] Dans cette étude sur laquelle on reviendra à plusieurs reprises, le traitement à raison d'1L/semaine a duré 8 semaines. L'observation du devenir des colonies s'est prolongé jusqu'à la vingtième semaine après traitement.

6.4.3. Effets sur le butinage

L'effondrement de l'intensité du butinage est le premier symptôme constaté lors d'un empoisonnement des abeilles par les pyréthrinoïdes (e.a. Rieth 1986). Cet effet est toutefois totalement réversible et les abeilles qui survivent à l'intoxication reprennent le chemin de la culture dès que le niveau de contamination de celle-ci est retombé sous le seuil produisant l'effet (Rieth 1986).

Ramirez-Romero *et al.* ont comparé l'intensité de butinage d'abeilles ayant ingéré du sirop contaminé avec de l'imidaclopride (48 ppb), de la deltaméthrine (500 ppb) et de la protéine transgénique Cry 1Ab. La deltaméthrine affecte fortement le butinage, qui diminue sensiblement ; il y a récupération partielle après le traitement (Ramirez-Romero *et al.* 2005).

La deltaméthrine provoque par ailleurs la paralysie des butineuses selon Faucon *et al.* 1985 (in Dai *et al.* 2010), un effet qui est à rapprocher de l'effet knock-down tel que décrit par Rieth (voir point 6.1. ci-dessus).

6.4.4. Effets sur l'olfaction et l'apprentisage

Taylor *et al.* ont testé l'effet de six pyréthrinoïdes sur le comportement d'apprentissage de l'abeille (réflexe d'extension de la langue) : fluvalinate, fenvalerate, perméthrine, cyperméthrine, cyfluthrine, flucythrinate. Dans cette étude, les abeilles contaminées ont été exposées aux concentrations létales 50 des différentes substances (ce sont les 50% de survivantes). Tous les composés réduisent le nombre de réponses réflexes, quel que soit le nombre d'essais d'entraînement par rapport aux abeilles de contrôle qui donnent déjà 60% de réponses positives après un unique essai d'entraînement. Il faut aux abeilles contaminées 3 à 4 essais pour arriver au même résultat ; et celui-ci ne s'améliore plus ensuite, alors que les abeilles non contaminées réussissent le test à plus de 90% après 4 essais. (Taylor *et al.* 1987).

Decourtye *et al.* ont testé ce même réflexe d'extension de la langue après avoir exposé des abeilles à 9 molécules différentes, et cela à une gamme de concentrations dont la plus haute correspondait au vingtième de la dose létale 50 ($DL_{50}/20$). Plusieurs molécules, dont la deltaméthrine, ont des effets sur l'apprentissage à cette dose. La λ-cyalothrine, la cyperméthrine, le τ-fluvalinate n'ont pas d'effet sur l'apprentissage aux doses testées (Decourtye *et al.* 2005).

Outre les effets sur le butinage, Ramirez-Romero *et al.* ont comparé les effets de la deltaméthrine (500 ppb), de l'imidaclopride et de la protéine Cry 1Ab sur la capacité d'apprentissage. La deltaméthrine affecte significativement celle-ci, et la récupération après traitement n'est que très partielle (Ramirez-Romero *et al.* 2005).

Une autre étude a consisté en un test double, à la fois en tunnel sur fleurs artificielles, et en laboratoire par test du PER, pour déterminer l'influence sur les capacités d'apprentissage de l'imidaclopride et de la deltaméthrine. La deltaméthrine était dosée à 500 ppb (la dose cumulée reçue sur les 6 jours de traitement est estimée à 700 ng/abeille); cette dose a été choisie car c'est la concentration maximale retrouvée dans des fleurs de colza après un traitement au Decis® Micro. A cette dose des effets létaux et des symptômes d'intoxication nerveuse (tel tremblements, paralysie : effet knock-down) ont été constatés. Les abeilles qui ont été soumises au test du PER étaient collectées parmi les abeilles allant au nourrisseur, contaminé pendant le traitement, non contaminé après la période de traitement. Le nombre de visites au nourrisseur a été fortement réduits dès que le sirop a été contaminé à la deltaméthrine mais contrairement à ce qui a été observé avec l'imidaclopride, cette baisse d'activité ne s'est pas poursuivie après la fin du traitement : le nombre d'abeilles allant au nourrisseur s'est accru jusqu'à retrouver dès le second jour un niveau comparable à ce qu'il était en début d'expérience, avec le sirop non contaminé. L'activité à l'entre de la ruche n'a pas été affectée. Au contraire de

ce qui s'est produit lors des études précédentes, la deltaméthrine à cette dose n'a pas davantage affecté la capacité d'apprentissage de l'abeille ni sa faculté de discrimination des odeurs, ni dans le test en tunnel ni dans le test en laboratoire. Les auteurs notent que les effets létaux constatés ont peut-être eu pour conséquence de supprimer les abeilles sensibles au toxique, ce qui pourrait expliquer que les performances des autres ne sont pas affectées. Aucun effet interne à la colonie n'a été constaté, ce qui peut être également le résultat de l'effet létal, qui a pour conséquence de limiter l'apport du toxique à la ruche (Decourtye *et al.* 2004).

Kadala *et al.* ont étudié au niveau cellulaire l'effet de la tétraméthrine et de la perméthrine (deux pyréthrinoïdes de type I) sur de neurones récepteurs de l'olfaction des lobes antennaires de l'abeille, mis en culture cellulaire ; leurs résultats confirment la perturbation de l'influx au niveau de ces neurones : les pyréthrinoïdes y prolongent artificiellement l'ouverture des canaux Na^+ (Kadala *et al.* 2011).

L'abeille n'est pas la seule à montrer ce type d'effet : chez d'autres espèces aussi (*Antheracea sp.*, *Bombyx mori*, *Grapholita molesta*, *Pectinophora gossypiella*), la perméthrine perturbe le sens de l'odorat et en particulier la perception des phéromones. (Taylor *et al.* 1987).

6.4.5. Effets sur l'orientation

Vandame *et al.* ont testé en tunnel l'effet de la deltaméthrine en concentration sublétale. Les abeilles ont été exposées au toxique (2,5 ng/abeille) via une tour de pulvérisation, qui permet la conversion dosage sur abeille/taux d'application au champ - les 2,5 ng/abeille correspondant en fait à 0,5g/ha, soit 10 à 20 fois moins que le taux d'application prescrit (5-10g/ha). Les abeilles ainsi traitées perdent le sens de l'orientation : devant faire un trajet entre ruche et nourrisseur de 8 m, elles partent dans la direction du soleil au lieu départir dans celle de la ruche – en fait, alors que la direction de vol d'une abeille de contrôle est calculée d'après celle du soleil, les abeilles traitées ne font plus le calcul et repartent systématiquement dans la direction du soleil. Logiquement, le temps de vol de retour à la ruche est allongé chez les abeilles traitées, par rapport aux contrôles (Vandame *et al.* 1995).

6.4.6. Effets sur la thermorégulation

La deltaméthrine induit chez l'abeille une hypothermie significative dès 2,5 ng/ab. On sait que l'abeille peut émettre de la chaleur pour maintenir ou accroître sa température interne en contractant de manière tétanique ses muscles de vol (le *shivering* des anglophones). Mais on sait par expérience (Vandame *et al.* 1995) que la dose de 2,5 ng/ab, si elle affecte la capacité d'orientation de l'abeille los du vol de retour, n'affecte pas la capacité de voler. Ce n'est donc pas au niveau musculaire que se situe l'incapacité de l'abeille à maintenir sa température : l'action toxique de la deltaméthrine se situe donc ailleurs. Elle pourrait être due à son action cholinergique au niveau cérébral, ou encore à son effet sur les ATPases, dont le rôle dans le métabolisme énergétique est fondamental ; le fait que cette action hypothermiante est puissamment synergisée par les fongicides azoles, qui sont eux-mêmes des inhibiteurs des ATPases, donne du crédit à cette dernière hypothèse (Vandame & Belzunces 1998).

Toute atteinte aux facultés de thermorégulation de l'abeille est susceptible d'avoir d'importants effets sur la colonie surtout au printemps lorsque les colonies ont parfois à faire face à des températures basses alors qu'elles ont déjà du couvain à couver (Belzunces *et al.* 2012). En outre, des abeilles peuvent être perdues suite à un tel phénomène, car l'abeille ne peut voler qu'au-delà d'une température minimale (environ 11°C chez les ouvrières, 13°C chez les mâles (Hrassnigg & Crailsheim 2005)) ; l'hypothermie peut donc avoir pour conséquence l'incapacité de voler, qui si elle dure plus de 2 heures épuise définitivement les réserves énergétiques de l'abeille qui ne peut dès

lors plus retourner à la ruche (INRA 2003 non publié). Enfin, l'hypothermie aggrave la toxicité des molécules puisque celle-ci s'accroît lorsque la température s'abaisse (Blum & Kearns *in* Cox & Wilson 1984).

6.4.7. Effets sur la reproduction

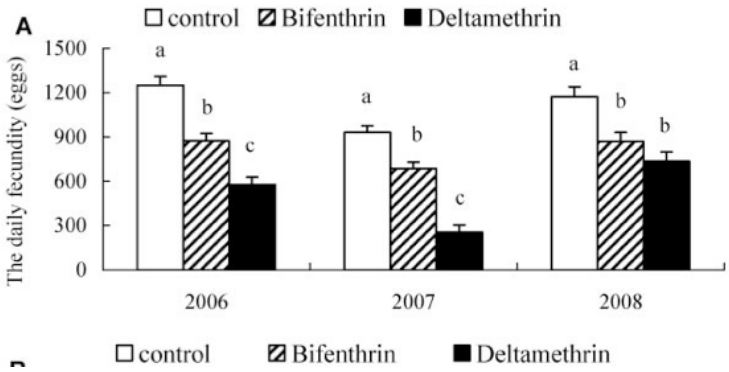
Dai *et al.* ont testé l'effet d'un nourrissement au sirop contaminé sur la fertilité de la reine, et sur le développement ultérieur des larves.

Deux molécules ont été testées :

-la bifenthrine (4 à 60,2 mgL^{-1})

-la deltaméthrine (20 à 210 mgL^{-1}).

Le nombre d'œufs par jour est diminué drastiquement par les deux composés, plus encore par la deltaméthrine que par la bifenthrine.



(source du schéma : Dai et al. 2010)

Les substances n'affectent pas le taux d'éclosion ; mais la deltaméthrine allonge clairement le temps de développement jusqu'à l'émergence (Dai *et al.* 2010).

Cet effet d'allongement du temps de développement dû à une contamination par les xénobiotiques a été montré également par l'étude de Wu *et al.,* qui a montré que des larves mettent plus de temps à se développer dans des cires contaminées. Les cires contaminées utilisées dans cette étude contenaient un vaste panel de pesticides : 39 en tout, dont 4 se rattachent au groupe des pyréthrinoïdes (Wu *et al.* 2012).

Des essais par contamination continue de colonies à la cyperméthrine (12,5 μgL^{-1} de Cymbush à 100g/L d'éther de pétrole, 1 L par semaine et par colonie) montrent que celle-ci a pour effet d'accroître le taux de supersédures[39] dans les colonies traitées et l'effondrement des surfaces de couvain : le nombre d'œufs s'accroît pendant les 6 premières semaines puis décroît pour atteindre le nombre critique de 600 œufs par ruche la 17ème semaine. Ces effets ont été suivis d'une importante mortalité dans les ruches triatées, mortalité croissant entre la 14ème et la 20ème semaine après le début du traitement (Bendahou *et al.* 1999b).

6.4.8. Effets sur les indicateurs biologiques

Les pyréthrinoïdes ont un effet toxique non seulement au niveau des canaux Na^+ voltage-dépendant, mais également sur l'acétylcholinestérase. Des abeilles mortes après contact avec une dose létale de deltaméthrine montrent un effondrement de l'activité de l'AChE , tandis qu'au contraire, chez les abeilles survivantes ce taux d'activité est multiplié par 2,5. Si l'effet inhibiteur de la deltaméthrine dans l'abeille morte est partagé par les organophosphates et les carbamates, l'effet d'accroissement de l'activité de l'AChE chez

[39] La supersédure est une situation dans laquelle la ruche a deux reines simultanément, généralement une jeune reine vierge et une reine en ponte (il peut se trouver aussi deux reines en ponte mais ce cas est moins fréquent). Le supersédure reste exceptionnelle dans un rucher « normal ». La multiplication des supersédures pourrait être due à une perturbation phéromonale, car normalement les phéromones royales inhibent chez l'ouvrière le comportement de mise en œuvre de cellules royales ; par ailleurs les phéromones permettent le repérage aisé d'une reine par une autre, et son élimination par combat. Ces dernières années les éleveurs de reines se plaignent d'un taux croissant de supersédures, situation gênante dans ce type d'exploitation.

l'abeille vivante est spécifique de la deltaméthrine ; l'activité de l'AChE constitue donc un biomarqueur intéressant de celle-ci (Badiou *et al*. 2008).

Les effets des pyréthrinoïdes se marquent également au niveau sanguin. Les sécrétions hormonales sont modifiées, effet qui est dû à l'action des pyréthrinoïdes sur les cellules neurosécrétrices ; glycémie et lipémie sont modifiées en conséquence. Une injection de deltaméthrine à dose sublétale (0,05 g/abeille) est ainsi suivie par une hypoglycémie et une hyperlipémie dans les heures qui suivent l'injection (Bounias *et al*. 1985, Bendahou et al. 1999a). Au niveau musculaire, l'activité des ATPases qui lient Na^+ et K^+ est diminuée (20% à 0,2 nM/ab, 43% à 1 nM/abeille (Bendahou et al, 1999a).

De même la contamination continue par des très faibles doses de cyperméthrine (12,5 µg/L de sirop de Cymbush, contenant 100g/L d'éther de pétrole, 1 L par semaine et par colonie) modifie la glycémie (glucosémie et tréhalosémie) des abeilles contaminées. Ces modifications du métabolisme des sucres sont susceptibles d'affecter la survie de l'abeille qui aurait à effectuer de longs vols, avec pour conséquence de compromettre le retour des butineuses à la ruche. En outre, cette contamination chronique provoque l'inhibition des ATPases (Bendahou *et al*. 1999b).

6.4.9. Effets sur les tissus et les organes

Kakamand *et al*. ont testé les effets, sur les cellules de l'intestin de l'abeille, d'une contamination orale par des sirops contaminés avec des concentrations variant de 1 à 10 ppm. A 10 ppm la deltaméthrine tue plus de 93% des abeilles (ce à quoi on pouvait s'attendre : 30µL à 10 ppm représentent 230 ng/abeille quand la DL_{50} aiguë est de 79 ng/abeille). A la moitié de cette dose de nombreuses cellules ont explosé. La concentration minimale n'endommage que très peu le tissu (Kakamand *et al*. 2008).

Appliquée sur le cœur semi-isolé de l'abeille, la deltaméthrine provoque un accroissement temporaire de la force et de la fréquence des contractions cardiaques (avec un effet inverse de la dose, la dose la plus faible produisant l'accroissement le plus marqué); toutefois, après 3 à 5 minutes, la force des contractions décroît de même que, dans une moindre mesure, leur fréquence, et une arythmie marquée apparaît. Cette action est imputable à l'effet de la substance sur les canaux Na^+, mais aussi sur les ATPases et vraisemblablement sur l'octopamine, un neurotransmetteur essentiel de l'abeille. Elle n'est pas réversible par rinçage de la préparation (Papaefthimiou & Theophilidis 2001).

Les insecticides ne sont pas seuls à avoir un tel effet : le 2,4D et les triazines (herbicides) sont également cardiotoxiques chez l'abeille (revu par Belzunces *et al*. 2012).

6.5. Effets sur les larves

Il n'y a pas à notre sens d'étude véritable des effets des pyréthrinoïdes sur les larves d'abeilles, ce qu'il faut regretter puisque ces composés peuvent être présents dans le pollen comme on l'a vu. Une seule étude à note connaissance (Gregorc & Ellis 2011) a testé les effets de diverses substances, dont un pyréthrinoïde, sur les cellules de la paroi intestinale de l'abeille. Les effets sont minimes mais le pyréthrinoïde testé est le fluvalinate dont on sait qu'il est particulièrement peu toxique pour l'abeille. Le peu d'effet pourrait être du à l'apparition d'une résistance chez la larve d'abeille, due à la présence fréquente du composé dans les ruches.

6.6. Synergies

6.6.1. Synergie avec d'autres substances chimiques

Fongicides azoles

La synergie la plus connue est celle que forment les pyréthrinoïdes avec les fongicides azoles. Cette synergie a fait l'objet de nombreuses études depuis qu'elle a été mise en

évidence au début des années '90 (sur l'abeille : Colin & Belzunces 1992 ; Pilling & Jepson 1993 ; Pilling *et al.* 1995). Elle est utilisée couramment dans les produits biocides, en particulier dans les produits de protection du bois, qui allient à la cyperméthrine le propiconazole et le tebuconazole (voir le point 7 ci-dessous).

Les azoles, qui sont des inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol, agissent au travers du cytochrome P450, auquel ils se lient, et duquel ils seraient – cela a été montré pour plusieurs d'entre eux – des inhibiteurs (Banke-Nørgaard 2008). La théorie la plus courante expliquant cet effet, est que le fongicide bloque l'action de l'enzyme alors que celle-ci intervient dans la métabolisation de l'insecticide (voir point 2.2.4. de l'introduction de ce rapport), d'où l'effet synergique, exactement comme c'est le cas du PBO évoqué ci-dessous.

Cette action synergique est particulièrement marquée avec le prochloraz. Notamment, une étude menée *in vitro* et *in vivo* sur l'action combinée du prochloraz et de la λ-cyalothrine montre que le fongicide ralentit la métabolisation et l'excrétion de l'insecticide, ce qui a pour effet d'en accroître considérablement l'activité (Pilling *et al.* 1995). Dans le même ordre d'idées, le prochloraz accroît le taux de recouvrement à l'analyse de la deltaméthrine dans l'abeille, tant immédiatement après l'exposition que 3 heures après celle-ci (Vandame & Belzunces 1995).

Meled *et al.* ont investigué les effets de la synergie prochloraz-deltaméthrine pour différentes doses de l'insecticide, sur les abeilles d'hiver et sur les abeilles d'été. Les essais ont considéré la mortalité des abeilles après application unique à la tour de Potter, celle-ci simulant la pulvérisation en champ. Sur les abeilles d'été, la deltaméthrine à la dose de 125 mg/ha provoque une mortalité corrigée de 63 ± 5% ; à la dose de 62,5 mg/ha, la mortalité est encore de 32,5±3,5%. La dose sans effet de deltaméthrine, combinée au prochloraz, est évaluée à 31,25 mg/ha. Les abeilles d'hiver apparaissent beaucoup moins sensibles : il faut une dose d'insecticide de 500mg/ha pour provoquer une mortalité significativement différente de celle des contrôles (47±11,6% à cette dose). Les doses de deltaméthrine et de prochloraz utilisées lors de l'expérience étaient 60 à 120 fois et 18 à 24 fois plus basses, respectivement que celles utilisées usuellement au champ au moment de l'étude (Meled *et al.* 1998).

Le difenoconazole et le prochloraz diminuent sensiblement les doses pour lesquelles la deltaméthrine induit l'hypothermie de l'abeille : alors qu'il faut 2,5 ng/ab de deltaméthrine seule pour induire un tel effet, celui-ci est déjà signifiant dès 1,5 ng/ab avec les deux fongicides, l'effet du prochloraz étant encore relativement plus marqué que celui du difénoconazole (Vandame & Belzunces 1998).

Le prochloraz accroît l'activité de la deltaméthrine sur le muscle cardiaque : la synergie des deux composants accroît de 100 fois la cardiotoxicité de la deltaméthrine et de 10 fois celle du prochloraz considéré seul (Papaefthimiou & Theophilidis, 2001).

Selon les études plus récentes, la synergie s'expliquerait moins par l'inhibition de la métabolisation de l'insecticide par le fongicide, que par l'action conjointe des deux substances sur des cibles communes, comme l'ATPase et les canaux calcium et potassium qui sont largement impliqués dans l'activité musculaire et nerveuse (revu par Belzunces *et al.* 2012), ainsi que, au niveau cardiaque, sur la communication intercellulaire (jonctions à trous[40]) (Papaefthimiou & Theophilidis 2001).

<u>Piperonyl butoxide (PBO)</u>

[40] C'est par ce type de jonctions que se propage l'onde d'excitation en provenance du tissu nodal et qui provoque la contraction des cellules du muscle strié cardiaque (*Gap junctional intercellular communication*)

Inhibiteur du cytochrome P-450, le piperonyl butoxide freine la métabolisation des pyréthinoïdes ce qui accroît leur durée d'action. Il facilite en outre l'absorption percutanée des pyréthrines. En outre, le PBO, qui a par lui-même un léger effet d'inhibition des ATPases, potentialise fortement l'effet inhibiteur des ATPases qu'ont par eux-mêmes les pyréthinoïdes (Kakko *et al.* 2003, étude faite sur des cellules cérébrales de rat).

Chez l'abeille, le PBO potentialise les pyréthinoïdes, et cette action synergique est d'autant plus forte que la molécule est mieux détoxifiée par la monooxygénase à cytochrome P450. Une application de PBO préalable à celle de l'insecticide (100μg/abeille, une heure avant traitement), multiplie la toxicité létale de la cyfluthrine par 30 et celle du τ-fluvalinate par 980 (Johnson *et al.* 2006).

Le PBO est utilisé dans certains biocides en association avec un pyréthrinoïde (par ex. Vapona tablette, avec l'allethrine).

Autres composés

Après pré-traitement au coumaphos (un insecticide/acaricide organophosphoré), la DL_{50} du τ-fluvalinate décroît ; l'importance de cette décroissance est fonction de la dose de coumaphos utilisée en pré-traitement. Elle est quasi nulle pour un pré-traitement de 0,1 μg/abeille de coumaphos ; mais la DL_{50} du τ-fluvalinate diminue dès 0,3 μg de coumaphos et s'effondre pour atteindre 0,2 μg/abeille si celle-ci a subi un pré-traitement de 10 μg/abeille de coumaphos (Johnson *et al.* 2009). Cet effet pose question dans la mesure où ces deux substances sont utilisées dans le cadre de la lutte contre la varroose ; toutes deux liposolubles, elles ont tendance à s'accumuler dans les cires, de sorte que des abeilles traitées une année avec un produit, et l'année suivant avec le second, risquent fort d'avoir à faire face à un effet cocktail.

Les effets de la deltaméthrine sur l'activité de l'AChE sont accrus par l'action conjointe de pirimicarbe (carbamate) (Badiou *et al.* 2008).

Enfin, certains fongicides ont pour effet de diminuer la répulsivité de l'α-cyperméthrine et de la λ-cyalothrine, un effet qui se marque particulièrement avec le chlorothalonil, le tebuconazole et l'iprodione/thiophanate-méthyl (revu par Belzunces *et al.* 2012).

6.6.2. Synergies avec les agents pathogènes

Wu *et al.* ont montré que des larves élevées dans des rayons contaminés par des pesticides donnent à l'émergence des abeilles plus sensibles à la nosémose. Les chercheurs ont découpé des morceaux de rayons contenant du couvain dans des ruches où la contamination était avérée et les ont fait élever en même temps que des morceaux de rayon avec couvain provenant de colonies non contaminées ; ces différents morceaux de rayon ont été placés dans deux ruches dont l'une a été contaminée par du sirop contenant des spores de nosémose, et les abeilles nouvellement émergées provenant des différents morceaux de rayons, contrôles et traités, ont été marquées. Les abeilles émergées des cellules contaminées montrent des taux d'infestation bien supérieurs à ceux des abeilles de contrôle, et cela dans les deux colonies. Les pesticides impliqués dans cette étude sont variés ; ils incluent notamment des organophosphorés et des pyréthrinoïdes, dont la perméthrine et le fluvalinate (Wu *et al.* 2012).

6.7. Effets sur d'autres espèces d'abeilles

6.7.1. Abeilles coloniales

Sharma et Pal Abrol ont comparé les toxicités de contact (en fait, la rapidité avec laquelle survient la mortalité par contact avec un substrat contaminé) de plusieurs insecticides

chez *Apis mellifera* et chez *Apis cerana*. Il ressort de cette étude que la mortalité survient relativement plus vite chez *A cerana* que chez *A mellifera* ; la première serait donc relativement plus sensible que la seconde, notamment à la cyperméthrine et à la deltaméthrine. Au reste, la méthode utilisée ne permet guère d'autres conclusions, principalement parce que toutes les concentrations utilisées sont létales à 100% à 36 heures tout au plus (Sharma & Pal Abrol 2005).

6.7.2. Abeilles solitaires

Tasei *et al.* ont établi les DL_{50} (contact, aigu) et seuils d'innocuité (DL1) chez les mâles et les femelles de *Megachile rotundata*. La DL_{50} est de 5,2 ng chez les mâles et 12 ng chez les femelles. Les DL1 sont de 1 et 2 ng/abeille respectivement. Les doses sublétales entraînent des mortalités postérieures aux 48 heures d'observation prescrites dans les tests d'établissement des seuils de mortalité.

Chez les mâles la surmortalité apparaît dès J+3 et s'élève, par rapport aux contrôles, jusqu'à J + 6 où le test s'arrête suite aux mortalités dans les contrôles. Toutes les doses testées produisent un effet et celui-ci est dose-dépendant : les doses testées s'échelonnent de 4 à 800 pg/abeille.

Chez les femelles la surmortalité apparaît à J+7 et la différence avec le contrôle croît jusqu'à J+12 pour la dose de 800 pg ; au reste l'effet n'est pas dose-dépendant, 32 pg paraissant écourter la vie des femelles alors que ce n'est pas le cas de 160 pg.

Une altération de la fécondité des femelles (taux de ponte réduit de 20%) est notée à la dose de 2 ng/abeille et se poursuit pendant le reste de la vie de l'abeille.

A 1 ppm de deltaméthrine dans le pollen la survie larvaire est compromise (55% ne parviennent pas à filer le cocon) ; à 0,1 ppm ce pourcentage est de 33%. Les doses plus basses n'ont eu aucun effet significatif sur les larves et sur leur développement (Tasei *et al.* 1988).

7. Toxicité pour le milieu aquatique

La toxicité pour le milieu aquatique est une caractéristique bien connue des pyréthrinoïdes. Pour les poissons, comme pour la grande majorité des invertébrés aquatiques, les CL_{50} de la deltaméthrine et de la cyperméthrine sont généralement inférieures à 1 μg/L, ce qui est très peu (un tableau de synthèse figure dans la thèse référencée Adam 2008, p. 53) ; seuls les mollusques font exception à cet égard. Cette forte toxicité est notamment marquée chez les insectes aquatiques, et une étude portant sur 8 espèces, dont 5 aquatiques et 3 terrestres, conclut à la plus grande susceptibilité des insectes aquatiques, par rapport aux insectes terrestres (Siegfried 1993). Les métabolites sont en revanche bien moins actifs et la DT_{50} dans l'eau (*ibid.*), surtout lorsqu'elle est exposée à la lumière, est relativement faible (voir point 3.2 ci-dessus).

Les incidents impliquant ces molécules sont donc principalement à caractère aigu ; mais ils peuvent être redoutables, comme le note une étude française qui compare les toxicités relatives, pur le milieu aquatique, du lindane et de la deltaméthrine. En dépit d'une DT_{50} de quelques heures dans l'eau, celle-ci est en effet capable de causer des dégâts étendus à la faune aquatique vu son extrême toxicité et sa grande rapidité d'action (Thybaud 1990).

8. Biocides à base de pyréthrinoïdes

On se limitera ci-dessous aux biocides à base de deltaméthrine et de cyperméthrine, les deux molécules qui ont été plus particulièrement ciblées.

Cyperméthrine

En tant que biocide, la cyperméthrine est d'emploi extrêmement courant (les quantités de produits venus sont, en masse, 15 fois supérieures à celles des produits à base de deltaméthrine). En Belgique, des produits biocides à base de cyperméthrine sont autorisés pour les usages suivants :

- lutte contre les insectes rampants (fourmis, blattes)
- lutte contre les insectes volants (mouches, notamment pour les bâtiments d'élevage, intérieur et extérieur)
- destruction des nids de guêpes
- produits de protection du bois (lutte contre les vers à bois et les termites); dans ces produits la cyperméthrine est parfois utilisée seule, mais le plus souvent associée à d'autres substances actives, en particulier
  - des fongicides azoles (propiconazole et tebuconazole (Axil, Cecil, Madurox, Prév-construct, Sarpeco, Xylophène) ; propiconazole seul (Basilit PCX-2, Madurox Super-Plus))
  - le 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate, qui est un fongicide et antimicrobien utilisé comme agent de préservation notamment dans les peintures et certains cosmétiques. On notera au passage que la toxicité de cette molécule est loin d'être nulle[41].
  - d'autres pyréthrinnoïdes (tétraméthrine – phénothrine (Kaporex))
- un usage vétérinaire (Flectron, mouches et culicoïdes des bovins) est toujours autorisé (dernière autorisation datant de 2012).

Les modes d'application sont extrêmement divers. Pour ce qui est des traitements du bois, il inclut le badigeonnage, le trempage et l'injection, ce dernier mode étant réservé aux professionnels. Les présentations sont également variées ; solutions émulsifiables, sprays, poudres… le produit vétérinaire est une boucle auriculaire.

Plusieurs de ces produits sont autorisés en usage professionnel uniquement ; d'autres sont autorisés pour les usages domestiques ; d'autres enfin sont autorisés en usage domestique mais certains modes d'application (injection du bois), certains types de lutte (destruction des nids de guêpes) ou certains quantités ne sont accessibles qu'aux professionnels.

La plupart des produits portent le pictogramme N. Un seul est classé (Cyperkill 10 EC, classe A : ventre réservée aux vendeurs enregistrés et utilisation aux utilisateurs agréés).

L'acte relatif au Flectron mentionne la possibilité de symptômes d'intoxication passagers chez l'utilisateur. Cette mention est rédigée comme suit : *Ce produit appartient aux pyréthroïdes. Lors de l'application, ils peuvent, en plus des effets possibles irritants et allergiques sur la peau, provoquer des réactions spécifiques (principalement sur le visage). Cela commence en général 1/2 h à 1 h après l'exposition et comprend picotement, sensation d'irritation ou insensibilité (engourdissement). Souffle bref, fièvre et toux sont possibles dans des cas très rares. Ce phénomène est passager et ne nécessite aucun traitement ultérieur.*

Deltaméthrine

Les usages de la deltaméthrine sont assez similaires à ceux de la cyperméthrine, sauf en ce qui concerne la protection du bois – la deltaméthrine n'est jamais utilisée à cette fin. On retrouve donc pour la deltaméthrine les usages suivants :

[41] Voir notamment http://www.env.gov.bc.ca/epd/ipmp/publications/tech_reports/antisapstain_chemicals/ipbc.pdf

- lutte contre les insectes rampants (fourmis, blattes)
- lutte contre les insectes volants (mouches, notamment pour les bâtiments d'élevage, intérieur et extérieur)
- destruction des nids de guêpes
- lutte contre les parasites animaux (Coopertix et Sputop, deux pour-on pour bovins)

Les produits sont des sprays, des poudres ou des solutions émulsifiables. Une des produits utilisés pour la lutte contre les insectes rampants (K-Othrine Flow 25) peut être pulvérisé pour atteindre les caches (dessous de plinthes etc.) ; il ne peut être utilisé qu'avec des équipements basse pression (il en va de même d'Agrichem Deltaméthrine mais ce produit semble n'être plus autorisé). Les produits où la concentration en substance active est de 10 ou 25g/L ne peuvent être utilisés que par des professionnels ; les produits d'usage domestique sont tous dosés à moins de 1%. Les actes de certains produits (Coopertix, Fannix) font mention de symptômes d'intoxication passagers chez l'utilisateur ; cette mention est rédigée comme suit : *Ce produit fait partie des pyréthrinoïdes. Lors de leur utilisation, ceux-ci peuvent, à côté d'effets possibles d'irritation et d'allergie sur la peau, provoquer des sensations spécifiques (principalement au visage) qui commence 1/2 heure à 1 heure après l'exposition. Cela consiste en des picotements, sensation de brûlure et absence de sensation (hypoesthésie). A de très rares occasions, des effets tardifs de dyspnée, fièvre et toux sont possibles. Cette réaction est transitoire et ne nécessite pas de traitement.*

8.1. Les actes d'autorisation

A l'exception de Madurox Sanio II, tous les produits à base de pyréthrinoïdes portent des phrases de risque relatives au milieu aquatique, entièrement justifiées par l'extrême toxicité de ces molécules, comme on l'a vu au point 7 ci-dessus. La plupart portent en outre le pictogramme N.

Cyperméthrine

Tous les produits contenant plus d'1% portent la phrase R50 (très toxique pour les organismes aquatiques) sauf un, noté R51 : Fendona (émulsion à 60g/L d'α-cyperméthrine).

Quatre des produits portent la phrase de risque R57 (dangereux pour les abeilles). Tous sont des produits de traitement du bois contenant, outre l'insecticide, des fongicides azoles ; toutefois d'autres produits de composition et d'usage similaire ne portent pas cette phrase de risque.

Quasiment tous les produits portent des phrases relatives à l'élimination de l'emballage et éventuellement du produit (S29/56, S60 S61); dans leur grande majorité, les produits à usage professionnel portent S60 et S61. Pour les poudres « insectes rampants » dont certaines applications sont réservées à l'usage professionnel, S29/56 s'applique à l'usage domestique et S60 S61 à l'usage professionnel. Madurox II et Sarpeco Aqua Multi ne portent aucune phrase de risque relative aux modes d'élimination des déchets.

Cyperkill est classé A. Exit 100 ne l'est pas alors que c'est un produit analogue : la concentration est sensiblement la même, les dilutions préconisées sont identiques ; l'usage en est plus étendu (les deux sont utilisés dans la lutte contre les insectes rampants, Exit 100 peut aussi être utilisé pour contrôles les mouches dans les bâtiments d'élevage).

Deltaméthrine

Tous les produits portent la phrase R50, sauf trois (des pulvérisateurs à 0,02 - 0,05% et Coopertix), qui portent la phrase R52.

Un seul porte la phrase R57 : Destrans KC CIK (pulvérisateur). Ce produit est analogue à K-Othrine insectes rampants et Destrans CIK, à ceci près qu'il contient aussi des pyréthrines.

Tous les produits dosés à plus de 1% portent les phrases S60 S61 (les deux produits vétérinaires Sputop et Coopertix n'ont pas S60). Fannix (lutte contre les mouches dans les locaux d'élevage) porte la phrase S35 : S35: *Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage*.

8.2. Exposition de l'abeille aux biocides à base de pyréthrinoïdes vendus en Belgique

L'exposition des abeilles aux pyréthrinoïdes ressortit principalement à deux voies :

- le contact direct
- le contact avec des eaux contaminées et l'absorption de celle-ci.

Nous avons connaissance de deux types d'incidents liés à l'usage des pyréthrinoïdes :

- l'usage de poudres destinées à la destruction des nids de fourmis et de guêpes, contre des ruches d'abeilles ; il s'agit là de délits liés à des problèmes de voisinage
- le nettoyage de bâtiments et de moyens de transports dans le cadre de la lutte contre le culicoïde du mouton, agent vecteur de la FCO. Ce nettoyage, aux moyens de produits analogues à Fannix ou Exit 10, est obligatoire en vertu de la directive 2000/75/CE (article 4 d iii) qui a été appliquée à la lettre en France. Des ruches situées aux alentours de bâtiments traités ont été anéanties et des analyses réalisées aux frais des apiculteurs et à leur initiative a montré la présence des substances actives (deltaméthrine dans le miel, bifenthrine et perméthrine dans les abeilles, etc…) de sorte que la cause est à considérer comme établie quoique n'ayant jamais été reconnue par l'ANSES.

Au reste, tous les produits susceptibles de contaminer les eaux par ruissellement (émulsions destinées au traitement du bois ou à l'élimination d'insectes rampants ou volants) sont susceptibles de contaminer les eaux si ils sont emportés par le ruissellement. Le contact des abeilles avec les poudres, hormis délits mentionnés ci-dessus, ne devrait être que très rare et reste donc une voie de contact tout à fait marginale.

8.3. Recommandations

Vu leur danger pour les insectes utiles et pour la faune aquatique, tous les produits devraient à notre sens porter le pictogramme N. Tous devraient également porter la phrase R57.

Pour ce qui est de l'élimination du produit et de son emballage, la phrase S35 nous semble peu appropriée ; mieux vaut spécifier comment l'élimination doit se faire.

Il pourrait être rappelé que la destruction des ruches à miel est un délit, et que les abeilles solitaires et sauvages méritent d'être protégées ; et que, en conséquence, les poudres à base de pyréthrinoïdes ne peuvent en aucun cas être utilisées à ces fins. Une sensibilisation du public est nécessaire, de même que l'information sur le danger réel des piqûres, beaucoup de gens se croyant à tort allergiques. Les craintes du public sont à rencontrer et à prendre en compte ; elles ne peuvent justifier l'extermination d'espèces dont le rôle-clé dans la biodiversité est déjà mis à mal par la perte des habitats et des ressources florales.

Enfin, une réflexion, s'agissant des produits de traitement préventifs et curatifs du bois : c'est pour les traitements curatifs contre les champignons que les doses sont les plus élevées. Prenons un exemple, celui de Reygnicide : les quantités maximum sont de 60 et 180g/m2 respectivement. En d'autres termes, avec ce dernier produit, l'insecticide est parfois appliqué à trois fois la concentration requise pour son efficacité, simplement parce

qu'il est joint au fongicide qui, lui, doit être bien plus concentré pour être efficace. En outre, la synergie entre fongicides azoles et pyréthrinoïdes ne paraît par avoir pour effet de diminuer les quantités de substances actives nécessaires à l'efficacité du produit : les concentrations en cyperméthrine utllisées avec les azoles sont sensiblement les mêmes que lorsque la cyperméthrine est utilisée seule (comparer Cecil professionnel multi-usages avec Axil Multi, par exemple). La séparation des deux types de traitement pourrait donc avoir un sens d'un point de vue environnemental.

Bibliographie :

Adam O, 2008: Impact des produits de traitement du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) : approches chimique, hydro-écologique et écotoxicologique, Université de Franche-Comté

Badiou A, Meled M and Belzunces LP, 2008: Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase - A biomarker to detect deltamethrin exposure, Ecotoxicology and Environmental Safety 69: 246–253

Banke-Nørgaard K 2008: Do EBI-fungicides synergise the effect of the pyrethroid insecticide alpha-cypermethrin on *Daphnia magna*, Master thesis, disponible sur Internet: http://ing.dk/modules/fsArticle/download.php?fileid=177

Belzunces, LP, Tchamitchian S and Brunet JL, 2012: Neural effects of insecticides in the honey bee, review, Apidologie, INRA, DIB and Springer-Verlag, DOI: 10.1007/s13592-012-0134-0

Bendahou N, Bounias M, Fleche C, 1999a: Toxicity of cypermethrin and fenitrothion on the hemolymph carbohydrates, head acetylcholinesterase, and thoracic muscle Na+,K+-ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera*. L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 139–146.

Bendahou N, Fléché C and Bounias M, 1999b: Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary Cypermethrin (Cymbush) on honeybee colonies (Hymenopterae: Apidae), Ecotoxicology and environmental safety 44: 147-153

Bos C & Masson C, 1983: Analyse des effets, en particulier de la répulsivite, d'un pyréthrinoïde de synthèse, la deltaméthrine, sur les abeilles, Agronomie 3 (6): 545-553

Bounias M, Dujin N and Popeskovic DS, 1985: Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alkaline phosphatases of honeybees, Pestic. Biochem. Physiol. 24: 149–160

Carrasco-Letelier L, Mendoza-Spina Y and Branchiccela MB, 2012: Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay, Chemosphere (2012), doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.062

Chauzat MP, Martel AC, Cougoule N, Porta P, Lachaise J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P and Faucon JP, 2010: An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France: Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 30 (1): 103–111

Colin ME and Belzunces LP, 1992: Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin: a convenient biological approach. Pestic. Sci. 36: 115-119

Cox RL and Wilson WT, 1984 : Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L (Hymenoptera : Apidae), Environ. Entomol. 13 : 375-378

Dai P-L, Wang Q, Sun J-H, Liu F, Wang X, Yan-Yan Wu Y-Y and Zhou T, 2010: Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee Apis mellifera ligustica, Environmental Toxicology and Chemistry 29 (3): 644–649

Dechaume-Moncharmont FX, Decourtye A, Hennequet C *et al.*, 2003: Statistical analysis of the honeybee survival after chronic exposure to insecticides. Environ Toxicol Chem 22(12): 3088-3094

Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M and Pham-Delègue MH, 2004 : Effect of Imidacloprid and Deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-flied and laboratory conditions, Ecotoxicology and Environmental Safety, 57, 410 – 419

Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., Pham-Delègue, M.H., 2005 : Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*, Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 48, 242 – 250

Delabie J, Bos C, Fonta C et Masson C, 1985 : Toxic and repellent effects of cypermethrin on the honeybee: Laboratory, glasshouse and field experiments. Pestic Sci 16: 409–415.

Demoute JP, 1989 : A breif review of the environmental fate and metabolism pf pyrethroids, Pest. Sci. 27 : 375-385

Erstfeld KM, 1999: Environmental fate of synthetic pyrethrinoids during spray drift and field run-off treatments in aquatic microcosms, Chemosphere 39(10): 1739-1767

Frazier M, Mullin C, Frazier J and Ashcraft S, 2008 : Pesticides : What have pesticides got to do with it ?, American Bee Journal, June 2008

Gregorc A and Ellis JD, 2011: Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (Apis mellifera L.) larvae treated with pesticides, Pesticide Biochemistry and Physiology 99: 200–207

INRA, 2003 : Rapport d'étude du programme « Impact de la contamination du miel par le fipronil sur l'activité et la survie des abeilles : aspects physiologiques et analytiques », Programme communautaire sur l'apiculture, convention 319-2, non publié

Hrassnigg N and Krailsheim K, 2005 : Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*), Apidologie 36 (2005) 255–277

Illarionov AI, 1991: Toxic effects of some insecticides on the honeybee. Agrokhimiya 8:121–125.

Johnson RM, Wen Z, Schuler MA et Berenbaum MR, 2006 : Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases, J. Econ. Entomol. 99 : 1046–1050

Johnson RM, Pollock RS and Berenbaum MR, 2009 : Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*, J. Econ. Entomol. 102 (2) : 474-479

Kadala A, Charreton M, Jakob I, Le Conte Y and Collet C, 2011: A use-dependent sodium current modification induced by type I pyrethroid insecticides in honeybee antennal olfactory receptor neurons, NeuroToxicology 32 (2011) 320–330

Kakamand FAK, Mahmoud TT, Amin ABM, 2008: The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honeybee *Apis mellifera* L. workers. Journal of Dohuk University 11 (1): 144-151

Kakko I, Toimela T, Tähti, H., 2000. Piperonyl butoxide potentiates the synaptosome ATPase inhibiting effect of pyrethrin. Chemosphere 40, 301–305.

Kakko I, Toimela T, Tähti, H., 2003 : The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin, Chemosphere 51 : 475-480.

Karise R., Viik E.and Mänd, M., 2007: Impact of alpha-cypermethrin on honey bees foraging on spring oilseed rape (Brassica napus) flowers in field conditions, Pest Manag Sci, 63: 1085-1089

Katagi T, 2010 : Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides in Aquatic Organisms, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 1 (204), DOI 10.1007/978-1-4419-1440-8_1, 132pp.

Meled M, Thrasyvoulou A and Belzunces LP, 1998: Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin, Environmental Toxicology and Chemistry 17 (12): 2517-2520

Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashkraft S, Simonds R, vanEngeldorp D and Pettis JS, 2010: High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. PLoS ONE doi:10.1371/journal. pone.0009754

Narahashi T, Zhao X, T Ikeda T, Nagata K, and Yeh JZ, 2007: Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity, Hum Exp Toxicol. 2007 April; 26(4): 361–366 (doi: 10.1177/0960327106078408)

Papaefthimiou C et Theophilidis G, 2001: The Cardiotoxic Action of the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin, the Azole Fungicide Prochloraz, and Their Synergy on the Semi-Isolated Heart of the

Bee *Apis mellifera macedonica*, Pesticide Biochemistry and Physiology 69, 77–91 (available online at http://www.idealibrary.com)

Perez-Santiago G, Otero-Colina G, Mota-Sanchez D, Ramirez-Guzman ME and Vandame R, 2000: Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (acari: varroidae) and *Apis mellifera* (hymenoptera: apidae) using two application techniques, Florida Entomologist 83(4): 468-476

Pilling ED and Jepson PC, 1993: Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*), Pesti.Sci. 39: 293-297

Pilling ED, Bromley-Challenor KAC, Walker CH, Jepson PC, 1995: Mechanism of λ-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (Apis mellifera L.). Pestic Biochem Physiol 51: 1–11

Ramirez-Romero R, Chaufaux J and Pham-Délègue MH, 2005: Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach, Apidologie 36: 601–611

Rieth JP, 1986 : The repellent effect of pyrethrinoids insecticides on honey bees, Physiological Entomology 13(2): 213–218

Sharma D and Pal Abrol D, 2005: Contact Toxicity of Some Insecticides to Honeybee Apis mellifera (L.) and Apis cerana (F.), J. Asia-Pacific Entomol. 8(1): 113-115

SanCo 2002 : Review report for the active substance deltamethrin, 17 October 2002, 6504/VI/99-final, disponible sur Internet (site de la division SanCo de l'UE)

SanCo 2005 : Review report for the active substance cypermethrin, 15 February 2005, SANCO/4333/2000 final, disponible sur Internet : (site de la division SanCo de l'UE)

Schleier JJ and Peterson RKD, 2011: Pytérhrin and pyréthrinoids, *in* O. Lopez and J.G. Fernandes-Bolanos (eds.), Green Trends in Insect Control, Royal Society of Chemistry No. 11, London, pp. 94-131

Siegfried B, 1993 : Comparative Toxicity of Pyrethroid Insecticides to Terrestrial and Aquatic Insects, Environmental Toxicology and Chemistry 12: 1683-1689

Tasei JN, Carre S, Moscatelli B et Grondeau C, 1988 : Recherche de la DL 50 de la deltamethrine (Decis) chez *Megachile Rotundata* F. abeille pollinisatrice de la luzerne (*Medicago sativa L.*) et des effets de doses infraléthales sur les adultes et les larves. Apidologie 19 (3): 291–306

Taylor KS, Waller GD and Crowder LA, 1987: Impairment of a classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides, Apidologie 18 (3): 243–252

Thybaud E, 1990 : Ecotoxicologie du lindane et de la deltaméthrine en milieu aquatique, Revue des sciences de l'eau 3: 195-209

Vandame R, Meled M, Colin ME and Belzunces LP, 1995: Alteration of the homing-flight in the honeybee Apis mellifera L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. Environ. Toxicol. Chem. 14: 855-860

Vandame R and Belzunces, LP, 1998: Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation, Neuroscience Letters 251 (1): 57-60

Villa S, Vighi M, Finizio A and Bolchi Serini G, 2000: Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen, Ecotoxicology, 9: 287-297

Wu JY, Smart MD, Anelli CM and Sheppard WS, 2012: Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to Nosema (Microsporidia) infection, J. Invertebr. Pathol., doi:10.1016/j.jip.2012.01.005

Zhou T, Zhou W, Wang Q *et al.*, 2011: Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees Apis mellifera, Pesticide Biochemistry and Physiology 100: 35–40

Conclusion générale

Quels risques les biocides examinés présentent-ils pour les abeilles ?

Ces risques sont tout d'abord liés aux quantités de produits utilisées en Belgique.

Les chiffres de vente nous indiquent que l'usage biocide du fipronil et de l'imidaclopride est toujours marginal aujourd'hui en Belgique, du moins en comparaison de l'usage phytosanitaire de ces molécules, et c'est peu dire : en 2008 – seule année pour laquelle nous avons les chiffres dans les deux usages – il s'est vendu plus de 1200 fois plus de fipronil en phytosanitaire qu'en biocide ; pour l'imidaclopride ce chiffre est de 1500 environ. Vu l'extrême toxicité et la persistance dans l'environnement de l'imidaclopride et du fipronil, tous les usages de ces deux molécules n'en méritent pas moins un suivi attentif, d'autant plus que le marché peut évidemment connaître des évolutions.

S'agissant des pyréthrinoïdes, la situation est différente : en 2008 il s'est vendu quatre fois plus de cyperméthrine en biocide qu'en phytosanitaire ; pour ce qui est de la deltaméthrine par contre, il s'en est vendu, toujours la même année, 5 fois plus en usage phytosanitaire qu'en usage biocide. Dans ces deux derniers cas, en quantités vendues, l'usage biocide est significatif par rapport à l'usage phytosanitaire.

Intervient ensuite le mode d'exposition de l'abeille. La voie d'exposition la plus probable nous paraît être la contamination d'eaux de ruissellement par des produits solubles ou émulsifiés ; ceci concerne les produits appliqués à grande échelle, traitements du bois, traitement des locaux contre les mouches etc. Mais la contamination générale du milieu n'est pas à négliger si l'on considère les propriétés de substances telles que le fipronil et l'imidaclopride.

Limiter ces modes d'exposition est affaire de clarté et de cohérence des instructions, de contrôle des l'adéquation des usages et, surtout, de sensibilisation du public. L'utilisateur doit être conscient que l'emploi d'un biocide n'est jamais anodin, une conscience à développer tant via l'étiquetage des produits que par l'utilisation de médias d'information.

C'est pourquoi nous recommandons

- d'établir des règles de guidance pour la délivrance des autorisations,
- de développer l'information quant aux conditions d'utilisation
- d'informer largement le public quant aux alternatives possibles à l'utilisation de produits biocides
- de veiller à l'étiquetage rigoureux des produits, notamment en complétant les mentions obligatoires (phrases de risque, pictogrammes etc.) par des mentions attirant l'attention du public sur les risques des produits pour les insectes utiles, et notamment l'abeille, sur l'existence d'alternatives, et sur les moyens de s'informer à propos de celles-ci.

Nous espérons que ce travail pourra contribuer à une utilisation plus durable des biocides sur le territoire belge.