

Maisons-Alfort, le 6 mars 2009

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux résultats d'analyses sur mortalités d'abeilles en Pyrénées-Atlantiques

LA DIRECTRICE GENERALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 19 février 2009 par la Direction générale de l'Alimentation (DGA) d'une demande d'avis relatif aux résultats d'analyses sur mortalités d'abeilles en Pyrénées-Atlantiques.

Suite à des prélèvements effectués après enregistrement de mortalités d'abeilles dans le département des Pyrénées-Atlantiques en mai 2008, l'Unité pathologie des abeilles de l'Afssa-Sophia Antipolis a transmis les résultats d'analyses effectués par ce laboratoire à la Direction départementale des services vétérinaires des Pyrénées-Atlantiques.

La DGA demande à l'Afssa de lui indiquer :

- 1 si les doses de thiaméthoxam ou de clothianidine quantifiées dans les échantillons de pollen sont suffisantes pour expliquer les mortalités constatées au sein d'un rucher du département des Pyrénées-Atlantiques en mai 2008;
- 2 si elle est en mesure d'émettre une hypothèse sur l'origine des néonicotinoïdes quantifiés ou détectés dans les différentes matrices (pollen, abeilles).

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques" réuni le 24 et 25 février 2009 qui a pris en compte les rapports des deux experts nommés, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

#### 1 DOCUMENTS EXAMINÉS

- Quinze rapports d'analyse émis par le laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Ruminants de Sophia Antipolis et les Abeilles à l'attention de la Direction des Services Vétérinaires des Pyrénées-Atlantiques, dont l'objet est repris dans le tableau 1.

**Tableau 1** : récapitulatif des commémoratifs de prélèvements

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Site        | Analyses effectuées   |
|----------------|-------------------------|-------------|---|
| 20080304/1     | Abeilles vivantes       | Peyrehorade | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |
| 20080304/2     | Pelotes de pollen       | Peyrehorade | Analyse pollinique et recherche de résidus de néonicotinoïdes |
| 20080304/3     | Pelotes de pollen       | Peyrehorade | Analyse pollinique et recherche de résidus de néonicotinoïdes |
| 20080304/4     | Abeilles mortes         | Peyrehorade | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |
| 20080304/5     | Abeilles mortes         | Peyrehorade | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |
| 20080304/6     | Abeilles mortes         | Peyrehorade | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |
| 20080304/7     | Abeilles vivantes       | Hastingues  | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |
| 20080304/8     | Abeilles mortes         | Hastingues  | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |
| 20080304/9     | Couvain                 | Hastingues  | Examen bactérioscopique                                       |
| 20080304/10    | Couvain                 | Hastingues  | Examen bactérioscopique                                       |
| 20080304/11    | Abeilles vivantes       | Sames       | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes  |

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Site       | Analyses effectuées  |
|----------------|-------------------------|------------|--|
| 20080304/12    | Abeilles mortes         | Sames      | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes |
| 20080304/13    | Couvain                 | Hastingues | Examen bactérioscopique                                      |
| 20080304/14    | Abeilles vivantes       | Pau-Nord   | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes |
| 20080304/15    | Abeilles vivantes       | Pau-Nord   | Examen pathologique, recherche de résidus de néonicotinoïdes |

- le rapport d'un expert en méthode d'analyse,
- le rapport d'un expert entomologiste.

## 2 PRESENTATION DES RESULTATS D'ANALYSE

### 2.1 DESCRIPTIF DES SITES ET RECUEIL DES DONNEES

Les trois premiers sites se situent en zone agricole dans le département des Pyrénées-Atlantiques, le dernier site se situe à proximité d'une aire d'autoroute. Un descriptif précis, incluant la nature des cultures dans cette zone ainsi que les programmes phytosanitaires associés, n'est pas disponible.

Les deux apiculteurs intervenant chacun sur deux sites ont signalé des mortalités qualifiées d'"anormales" sur les sites de Peyrehorade, Hastingues et Sames, observées le 4 mai 2008 (sites de Peyrehorade et Hastingues) et le 13 mai (site de Sames). Des prélèvements additionnels ont été effectués le 13 mai sur le site de Pau-Nord par l'apiculteur propriétaire des ruches installées à Peyrehorade, afin de disposer de résultats d'analyse sur un site où aucune mortalité anormale n'a été observée.

Il convient de noter que les mortalités observées dans ces trois sites n'ont pas entraîné la perte des colonies concernées, ni des ruchers.

A la suite des observations de mortalités, des prélèvements d'abeilles, vivantes et mortes, et de couvain, ont été effectués par le technicien des services vétérinaires sur le site de Hastingues le 4 mai 2008 et sur le site de Sames le 13 mai 2008. Par ailleurs, pour les mêmes raisons, des prélèvements d'abeilles vivantes et mortes, ainsi que de pollen de trappes ont été effectués le 4 mai 2008 sur le site de Peyrehorade par l'apiculteur propriétaire de ce rucher, qui a également procédé à des prélèvements d'abeilles vivantes le 13 mai 2008 sur le site de Pau Nord. Ces échantillons ont été réceptionnés au laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Ruminants de Sophia Antipolis le 21 mai 2008, puis congelés. Les analyses ont été effectuées selon les modalités précisées dans le tableau 2.

**Tableau 2** : récapitulatif des dates et des analyses effectués par échantillon

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Site        | Analyses effectuées  | Dates des analyses   |
|----------------|-------------------------|-------------|--|--|
| 20080304/1     | Abeilles vivantes       | Peyrehorade | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-06/06/2008<br>non analysé (prélèvement insuffisant) |
| 20080304/2     | Pelotes de pollen       | Peyrehorade | Analyse pollinique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes  | 27/01/2009<br>15/01/2009-21/01/2009                            |
| 20080304/3     | Pelotes de pollen       | Peyrehorade | Analyse pollinique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes  | 27/01/2009<br>15/01/2009-21/01/2009                            |
| 20080304/4     | Abeilles mortes         | Peyrehorade | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-05/06/2008<br>24/06/2008                            |
| 20080304/5     | Abeilles mortes         | Peyrehorade | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-05/06/2008<br>12/09/2008                            |
| 20080304/6     | Abeilles mortes         | Peyrehorade | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-09/06/2008<br>16/09/2008                            |
| 20080304/7     | Abeilles vivantes       | Hastingues  | Examen pathologique  | 29/05/2008-06/06/2008  |

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Site       | Analyses effectuées  | Dates des analyses                  |
|----------------|-------------------------|------------|--|-------------------------------------|
|                |                         |            | Recherche de résidus de néonicotinoïdes                        | 16/09/2008                          |
| 20080304/8     | Abeilles mortes         | Hastingues | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-09/06/2008<br>16/09/2008 |
| 20080304/9     | Couvain                 | Hastingues | Examen bactérioscopique  | 29/05/2008                          |
| 20080304/10    | Couvain                 | Hastingues | Examen bactérioscopique  | 29/05/2008                          |
| 20080304/11    | Abeilles vivantes       | Sames      | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-09/06/2008<br>16/09/2008 |
| 20080304/12    | Abeilles mortes         | Sames      | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-09/06/2008<br>16/09/2008 |
| 20080304/13    | Couvain                 | Hastingues | Examen bactérioscopique  | 29/05/2008                          |
| 20080304/14    | Abeilles vivantes       | Pau-Nord   | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-09/06/2008<br>16/09/2008 |
| 20080304/15    | Abeilles vivantes       | Pau-Nord   | Examen pathologique<br>Recherche de résidus de néonicotinoïdes | 29/05/2008-09/06/2008<br>18/09/2008 |

Les examens pathologiques effectués sur les échantillons d'abeilles sont décrits dans le tableau 3.

**Tableau 3** : nature des examens pathologiques effectués sur les échantillons d'abeille

| Pathogène/agent infectieux recherché               | Méthode  |
|--|--|
| Virus de la paralysie chronique de l'abeille       | qRT-PCR, méthode interne   |
| Virus de la paralysie aiguë de l'abeille           | RT-PCR, méthode interne  |
| Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille | RT-PCR, méthode interne  |
| <i>Nosema</i> spp.                                 | Examen microscopique (méthode OIE) puis PCR Multiplexe méthode interne pour identification |
| Acariose   | Méthode OIE  |

La nature des analyses de résidus de produits phytopharmaceutiques, centrée sur les néonicotinoïdes, effectuées sur les échantillons d'abeille et de pollens est décrite dans le tableau 4.

**Tableau 4** : nature des analyses chimiques effectuées sur les échantillons d'abeille et de pollen

| Matrice  | Résidu recherché | Méthode                    | Sensibilité                                     |
|----------|------------------|----------------------------|---|
| Abeilles | Thiaméthoxam     | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,015 ng/abeille<br>LOQ = 0,05 ng/abeille |
| Abeilles | Clothianidine    | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,015 ng/abeille<br>LOQ = 0,05 ng/abeille |
| Abeilles | Imidaclopride    | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,015 ng/abeille<br>LOQ = 0,05 ng/abeille |
| Abeilles | Acétamipride     | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,015 ng/abeille<br>LOQ = 0,05 ng/abeille |
| Abeilles | Thiaclopride     | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,015 ng/abeille<br>LOQ = 0,05 ng/abeille |
| Pollen   | Thiaméthoxam     | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,15 µg/kg<br>LOQ = 0,5 µg/kg             |
| Pollen   | Clothianidine    | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 1 µg/kg<br>LOQ = 2,5 µg/kg                |
| Pollen   | Imidaclopride    | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 1 µg/kg<br>LOQ = 2,5 µg/kg                |
| Pollen   | Acétamipride     | LC/MS/MS (méthode interne) | LOD = 0,3 µg/kg<br>LOQ = 1 µg/kg                |

Enfin, l'examen bactérioscopique effectué sur couvain consiste en la lecture des résultats d'une coloration de Gram.

**2.2 RESULTATS**

Les résultats regroupés par sites sont repris dans les tableaux 5 à 9 ci-dessous :

**Tableau 5** : résultats des examens et analyses réalisés pour le site de Peyrehorade.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Ruche   | Analyses effectuées  | Résultat  |
|----------------|-------------------------|---|--|---|
| 20080304/1     | Abeilles vivantes       | Non précisée  | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp.<br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine  | Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>Prélèvement insuffisant<br>Prélèvement insuffisant |
| 20080304/2     | Pelotes de pollen       | Ruches équipées de trappes à pollen, pollen récolté entre le 27 avril 2008 et le 4 mai 2008 | <u>Aliquotes de pollen</u> (diverses variétés, pas de maïs) <sup>1, 2</sup> :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes broyées</u> (20 g) <sup>3</sup> :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes de pollen orange</u> (après tri des pelotes récoltées) :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes de pollen jaune</u> (après tri des pelotes récoltées) :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes de pollen vert</u> (après tri des pelotes récoltées) :<br>Thiaméthoxam      | 0,94 µg/kg<br>8,52 µg/kg <sup>4</sup><br>0,97 µg/kg<br>3,93 µg/kg<br>23,6 µg/kg                           |
| 20080304/3     | Pelotes de pollen       | Ruches équipées de trappes à pollen, pollen récolté entre le 4 mai 2008 et le 8 mai 2008    | <u>Aliquotes de pollen</u> (diverses variétés, pas de maïs) <sup>5, 6</sup> :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes broyées</u> (20 g) <sup>7</sup> :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes de pollen orange</u> (après tri des pelotes récoltées) :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes de pollen blanc</u> (après tri des pelotes récoltées) :<br>Thiaméthoxam<br><u>Pelotes de pollen vert-noir</u> (après tri des pelotes récoltées) :<br>Thiaméthoxam | 32,35 µg/kg<br>9,40 µg/kg <sup>8</sup><br>2,76 µg/kg<br>2,96 µg/kg<br>16,94 µg/kg                         |

<sup>1</sup> seule substance active quantifiée : thiaméthoxam, résultats < LOQ pour la clothianidine, l'imidaclopride et l'acétamipride

<sup>2</sup> aliquote de 2 g prélevée dans les 350 g de pollen récolté  
<sup>3</sup> 20 g de pollen non trié et broyé, 2 aliquotes de 2 g analysées

<sup>4</sup> Moyenne de 9,27 et 7,78 µg/kg pour les deux aliquotes de 2 g analysées

<sup>5</sup> seule substance active quantifiée : thiaméthoxam, résultats < LOQ pour la clothianidine, l'imidaclopride et l'acétamipride

<sup>6</sup> aliquote de 2 g prélevée dans les 350 g de pollen récolté

<sup>7</sup> 20 g de pollen non trié et broyé, 2 aliquotes de 2 g analysées

<sup>8</sup> Moyenne de 9,15 et 9,65 µg/kg pour les deux aliquotes de 2 g analysées

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Ruche   | Analyses effectuées  | Résultat   |
|----------------|-------------------------|---|--|--|
| 20080304/4     | Abeilles mortes         | Ruche 52<br>1000 à 3000<br>abeilles mortes au sol | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Nosema sp.<br><br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride | 4 x 10 <sup>5</sup> copies/abeille<br>Négatif<br>Négatif<br>1,54 x 10 <sup>4</sup> spores/abeille<br>( <i>N.cerenae</i> )<br>Négatif<br>< LOQ<br>< LOQ <sup>9</sup><br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ |
| 20080304/5     | Abeilles mortes         | Ruche 74<br>3000 à 5000<br>abeilles mortes au sol | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Nosema spp.<br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride    | 7 x 10 <sup>5</sup> copies/abeille<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>< LOQ<br>< LOQ <sup>10</sup><br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ  |
| 20080304/6     | Abeilles mortes         | Ruche 58<br>1000 à 3000<br>abeilles mortes au sol | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Nosema spp.<br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride    | 1,2 x 10 <sup>5</sup> copies/abeille<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>< LOQ<br>< LOQ <sup>11</sup><br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ  |

Les analyses polliniques des pollens de trappes prélevés sur le site de Peyrehorade sont reportées dans le tableau 6.

**Tableau 6** : résultats des analyses polliniques des pollens prélevés sur le site de Peyrehorade.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | couleur | Espèce végétale   | Pourcentage                            |
|----------------|-------------------------|---------|---|--|
| 20080304/2     | Pelotes de pollen       | Orange  | Pissenlit<br><i>Taraxacum</i> spp.<br>Trèfle blanc<br>Solidage<br>Indéterminé | 64,6%<br>33,3%<br>8,7%<br>1,4%<br>0,7% |

<sup>9</sup> le rapport conclut à la présence de traces de clothianidine, en raison d'un signal > LOD mais < LOQ.

<sup>10</sup> le rapport conclut à la présence de traces de clothianidine, en raison d'un signal > LOD mais < LOQ.

<sup>11</sup> le rapport conclut à la présence de traces de clothianidine, en raison d'un signal > LOD mais < LOQ.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | couleur   | Espèce végétale  | Pourcentage  |
|----------------|-------------------------|-----------|--|--|
| 20080304/2     | Pelotes de pollen       | Jaune     | Diplostaxix<br>Linaire<br>Solidage<br>Rosacées<br>Cornouiller sanguin<br>Chêne<br>Plantain<br>Pissenlit<br>Houx                | 60%<br>20%<br>5%<br>4,3%<br>3,7%<br>3,1%<br>2,5%<br>1,2%<br>0,6%             |
| 20080304/2     | Pelotes de pollen       | Vert      | Trèfle violet<br>Acacia<br>Trèfle blanc<br>Pissenlit<br>Rubus<br>Luzerne<br>Chêne<br>Crucifères<br>Houx<br>Cornouiller sanguin | 47,4%<br>30%<br>8,7%<br>5,8%<br>2,3%<br>1,7%<br>1,1%<br>1,1%<br>1,1%<br>0,6% |
| 20080304/3     | Pelotes de pollen       | Orange    | Pissenlit<br>Trèfle violet<br>Solidage<br><i>Taraxacum</i> spp<br>Crucifères   | 87%<br>5,5%<br>4,5%<br>2,5%<br>0,5%  |
| 20080304/3     | Pelotes de pollen       | Blanc     | Plantain<br>Cornouiller sanguin<br>Crucifères<br>Acacia<br>Trèfle blanc  | 72%<br>12,5%<br>11%<br>2,8%<br>1,4%  |
| 20080304/3     | Pelotes de pollen       | Vert-noir | Trèfle blanc<br>Trèfle violet<br>Chêne<br>Acacia<br>Cariophyllacées  | 76,4%<br>19%<br>2,7%<br>0,9%<br>0,9%   |

**Tableau 7** : résultats des examens et analyses réalisées pour le site de Hastings.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Ruche  | Analyses effectuées  | Résultat  |
|----------------|-------------------------|--|--|---|
| 20080304/7     | Abeilles vivantes       | Non précisée                                   | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp.<br><br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride | Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>$0,82 \times 10^6$<br>spores/abeille<br>( <i>N.cerenae</i> )<br>Négatif<br>< LOQ <sup>12</sup><br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ |
| 20080304/8     | Abeilles mortes         | Ruche non précisée, mortalités non quantifiées | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp.   | $7,59 \times 10^4$<br>copies/abeille<br>Négatif<br>Présence de génome viral<br>$1,16 \times 10^6$<br>spores/abeille<br>( <i>N.cerenae</i> )                         |

<sup>12</sup> le rapport conclut à la présence de traces de thiaméthoxam, en raison d'un signal > LOD mais < LOQ.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon       | Ruche              | Analyses effectuées  | Résultat  |
|----------------|-------------------------------|--------------------|--|---|
|                |                               |                    | Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride | Négatif<br>< LOQ<br>0,337 ng/abeille<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ |
| 20080304/9     | Couvain sans signes cliniques | Ruche non précisée | Examen bactérioscopique  | Négatif   |
| 20080304/10    | Couvain sans signes cliniques | Ruche non précisée | Examen bactérioscopique  | Négatif   |
| 20080304/13    | Couvain sans signes cliniques | Ruche non précisée | Examen bactérioscopique  | Négatif   |

**Tableau 8** : résultats des examens et analyses réalisées pour le site de Sames.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Ruche  | Analyses effectuées  | Résultat  |
|----------------|-------------------------|--|--|---|
| 20080304/11    | Abeilles vivantes       | Non précisée                                   | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp.<br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride     | 3,13 x 10 <sup>4</sup> copies/abeille<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br>< LOQ<br>< LOQ <sup>13</sup><br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ  |
| 20080304/12    | Abeilles mortes         | Ruche non précisée, mortalités non quantifiées | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp.<br><br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride | 7,59 x 10 <sup>9</sup> copies/abeille<br>Négatif<br>présence de génome viral<br><br>1,66 x 10 <sup>6</sup> spores/abeille ( <i>N.cerenae</i> )<br>Négatif<br>< LOQ<br>0,473 ng/abeille<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ |

**Tableau 9**: résultats des examens et analyses réalisées pour le site de Pau-Nord.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Ruche  | Analyses effectuées  | Résultat  |
|----------------|-------------------------|--|--|---|
| 20080304/14    | Abeilles vivantes       | Ruche 77<br>Moins de 20 abeilles mortes au sol | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp. | Négatif<br>Négatif<br>Négatif<br><br>3,24 x 10 <sup>6</sup> spores/abeille ( <i>N.cerenae</i> ) |

<sup>13</sup> le rapport conclut à la présence de traces de clothianidine, en raison d'un signal > LOD mais < LOQ.

| Rapport numéro | Nature de l'échantillon | Ruche                                  | Analyses effectuées  | Résultat  |
|----------------|-------------------------|--|--|---|
|                |                         |  | Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride   | Négatif<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ  |
| 20080304/15    | Abeilles vivantes       | Ruche 91, pas d'abeilles mortes au sol | Virus de la paralysie chronique de l'abeille<br>Virus de la paralysie aiguë de l'abeille<br>Virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille<br><i>Nosema</i> spp.<br><br>Acariose<br>Thiaméthoxam<br>Clothianidine<br>Imidaclopride<br>Acétamipride<br>Thiaclopride | Négatif<br><br>Négatif<br>Négatif<br><br>0,88 x 10 <sup>6</sup><br>spores/abeille<br>( <i>N.cerenae</i> )<br>Négatif<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ<br>< LOQ |

### 3 CONCLUSIONS DU RAPPORT SUR LES METHODES D'ANALYSES

La pertinence des données analytiques produites par l'Unité Pathologie de l'abeille du laboratoire de Sophia-Antipolis de l'Afssa a été évaluée par un expert rapporteur. L'examen des méthodes utilisées et de l'ensemble des données brutes permet de conclure qu'en dépit d'incertitudes liées aux modalités de prélèvement et à la représentativité des prises d'essai, les résultats analytiques transmis par ce laboratoire à la Direction des services vétérinaires des Pyrénées-Atlantiques sont acceptables et peuvent faire l'objet d'une interprétation dans le cadre de cette saisine.

### 4 INTERPRETATION DES RESULTATS

- **Site de Peyrehorade**

Les abeilles prélevées devant les trois ruches où des mortalités ont été observées étaient porteuses du virus de la paralysie chronique de l'abeille (tableau 5). Il n'est cependant pas possible de déterminer si les charges virales (1,2 à 7 x 10<sup>5</sup> copies de génome par abeille) affectaient l'état de santé des abeilles et/ou ont pu entraîner la mort de ces dernières. On retient cependant la présence systématique de ce virus dans les abeilles mortes.

Un seul lot d'abeille portait des spores de *Nosema* spp, identifiées comme *Nosema cerenae*, au taux de 1,54 x 10<sup>4</sup> spores/abeille (tableau 5). Le recensement des mortalités n'est pas suffisamment précis pour déterminer si les mortalités ont été relativement plus abondantes devant cette ruche, dont les abeilles portaient le virus de la paralysie chronique et des spores de *Nosema cerenae*, comparativement aux cas des deux autres ruches dont les abeilles étaient porteuses du virus seul.

Les rapports d'analyse mentionnent des traces de clothianidine dans les abeilles, inférieures à la limite de quantification (0,05 ng/abeille) (tableau 5). Cette limite de quantification est très inférieure à la dose sans effet observée de cette substance (2 ng/abeille après administration répétée) Compte tenu du caractère soudain des mortalités observées, l'hypothèse d'effets sublétaux à l'origine des mortalités est peu probable et ne saurait être expliquée par les résultats non quantifiables reportés ci-dessus.

L'origine de la clothianidine détectée dans les abeilles n'est pas connue. Bien que cette molécule soit un produit de dégradation du thiaméthoxam dans les matrices environnementales et dans le métabolisme animal et végétal, elle n'est formée qu'en proportions limitées et est toujours retrouvée avec, et en proportions moindres, que la molécule parent. La présence de clothianidine seule dans les abeilles relève donc d'une



exposition directe à cette dernière, dans des conditions difficiles à établir en l'absence de données environnementales.

Les échantillons de pollen récoltés durant les deux périodes de collecte par les abeilles (27 avril 2008 –4 mai 2008 et 4 mai 2008 –8 mai 2008) dans des ruches équipées de trappes contenaient du thiaméthoxam. Les résultats d'analyse portant sur les aliquotes de 2 g prélevées directement dans les sacs indiquent des teneurs différentes selon la période (0,94 µg/kg et 32,35 µg/kg, respectivement). Par comparaison, les résultats des analyses effectuées sur des aliquotes de 2 g prélevées sur 20 g de ces mêmes pollens après broyage indiquent des teneurs plus homogènes pour ces deux périodes (8,52 µg/kg<sup>14</sup> et 9,40 µg/kg<sup>15</sup>, respectivement).

Une analyse plus fine des teneurs en thiaméthoxam en regard des espèces florales représentées dans ces pollens (tableau 6) n'a pas été réalisée en l'absence d'indications sur l'environnement des ruches, et notamment sur la localisation éventuelle de parcelles ayant reçu un traitement avec cette substance active. Aucun de ces prélèvements ne contenait de pollen de maïs. La présence de pollen de maïs dans ces échantillons n'était au demeurant pas attendue, les pics de collecte du pollen de maïs par les abeilles étant plutôt observés de fin juillet à mi-août (Odoux *et al* 2004)<sup>16</sup>.

Le thiaméthoxam ne bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché que pour un usage en traitement des semences de maïs, son origine dans les pollens récoltés, provenant de diverses variétés végétales à l'exclusion de pollen de maïs, pourrait relever de l'émission de poussières de semences au moment du semis. Un descriptif précis, incluant la nature des cultures dans cette zone ainsi que les programmes phytosanitaires associés, n'étant pas disponible, il n'est pas possible d'attester cette hypothèse. Seule une localisation de parcelles semées avec du maïs traité avec la préparation Cruiser, en lien avec un recensement des espèces végétales en fleurs à proximité des parcelles au moment du semis aurait permis d'expliquer la présence de ces résidus dans les pollens récoltés dans les trappes.

La localisation des ruches équipées de trappes à pollen par rapport aux ruches dans lesquelles les mortalités ont été observées n'est pas précisée. Il n'est donc pas possible de déterminer *a priori* si les abeilles retrouvées mortes ont été exposées ou non à des pollens contenant des résidus de thiaméthoxam. Dans le doute, l'hypothèse d'une consommation de pollen par les abeilles a été considérée sur le plan théorique. La quantité de pollen consommée par les ouvrières est connue et significative pour les jeunes abeilles (entre 1 à 10 jours d'âge, période de maturation des glandes hypopharyngiennes). Durant cette période, une abeille consomme 65 mg de pollen (Rortais *et al* 2005)<sup>17</sup>. Les consommations de pollens pour les autres ouvrières (cirières, butineuses...) sont inconnues, voire anecdotiques (*ibid*). En considérant la concentration en thiaméthoxam la plus élevée (pollen à 32,35 µg/kg), et la consommation de 65 mg de pollen par abeille sur 10 jours, l'exposition attendue est estimée à 0,0021 µg/abeille, soit l'équivalent de la NOEL 10 jours (0,002 µg/abeille). Exprimée en dose journalière, l'exposition est équivalente à 0,00021 µg/abeille par jour soit environ 4% de la DL50<sup>18</sup> orale (0,005 µg/abeille en laboratoire). Ce niveau d'exposition est considéré comme insuffisant pour générer un phénomène de mortalité brutale. Par ailleurs, aucune trace de thiaméthoxam n'a été relevée dans les abeilles mortes ou vivantes (LOD<sup>19</sup> = 0,015 ng/abeille, pour une exposition sur 10 jours estimée à 2,1 ng/abeille en supposant la consommation d'aliquotes les plus concentrées en thiaméthoxam et une DL50 de 5 ng/abeille).

<sup>14</sup> Moyenne de 9,27 et 7,78 µg/kg pour les deux aliquotes de 2 g analysées

<sup>15</sup> Moyenne de 9,15 et 9,65 µg/kg pour les deux aliquotes de 2 g analysées

<sup>16</sup> Odoux J.F., Lamy L., Aupinel P. (2004) L'abeille récolte-t-elle du pollen de maïs et de tournesol ? La Santé de l'Abeille 201, 187–193.

<sup>17</sup> Rortais A, Arnold G, Halm MP et 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* 3671-83.

<sup>18</sup> DL50 : la dose létale 50 est une valeur statistique de la dose d'une substance/préparation dont l'administration unique par voie orale provoque la mort de 50 % des animaux traités.

<sup>19</sup> LOD : limite de détection

Sur la base de l'ensemble de ces éléments, l'hypothèse de la consommation de pollen contenant des résidus de thiaméthoxam comme pouvant être à l'origine des mortalités observées n'est pas retenue.

L'hypothèse d'une intoxication par contact peut également être vérifiée en considérant cette fois la DL50 contact (0,024 µg/abeille) et la quantité de pollen avec laquelle une abeille entre en contact en une journée. Pour atteindre cette dose toxique en transportant exclusivement du pollen contenant 32,3 µg de thiaméthoxam/kg, une butineuse devrait transporter 740 mg pollen par jour, soit à raison de 15 mg de pollen en moyenne par voyage, effectuer une cinquantaine de voyages. Ce calcul considère les concentrations maximales de thiaméthoxam analysées dans le pollen, un butinage centré exclusivement sur ce pollen et une absorption de la totalité du thiaméthoxam transporté au moment de l'élaboration de la pelote et du transport. Pour ces raisons et parce qu'aucune trace de thiaméthoxam n'a été détectée dans les abeilles mortes ou vivantes, cette hypothèse n'a pas été retenue.

- **Site de Hastings**

Sur ce site, une seule ruche est associée à des mortalités ayant conduit à un prélèvement. L'importance de ces mortalités n'est cependant pas précisée (tableau 7).

Les abeilles mortes prélevées devant cette ruche étaient porteuses du virus de la paralysie chronique ( $7,59 \times 10^4$  copies de génome par abeille), du virus israélien de la paralysie aiguë de l'abeille (présence de génome viral), ainsi que de spores de *Nosema* spp, identifiées comme *Nosema cerenae*, au taux de  $1,16 \times 10^6$  spores/abeille. Les abeilles vivantes prélevées sur ce même site étaient portaient des spores de *Nosema cerenae*, à hauteur de  $0,82 \times 10^6$  spores/abeille.

Les rapports d'analyse mentionnent des traces de clothianidine dans les abeilles mortes, à hauteur de 0,337 ng/abeille. Cette dose reste très inférieure à la dose sans effet de cette substance (2 ng/abeille après administration répétée). Comme sur le site de Peyrehorade, le caractère soudain des mortalités observées ne permet pas de retenir une hypothèse d'effets sublétaux à l'origine des mortalités. La présence de résidus de clothianidine à hauteur de 0,337 ng/abeille ne permet pas d'imputer une origine chimique aux mortalités observées.

- **Site de Sames**

Sur ce site comme sur le précédent une seule ruche est associée à des mortalités ayant conduit à un prélèvement. L'importance de ces mortalités n'est pas précisée (tableau 8).

Les abeilles mortes prélevées devant cette ruche étaient porteuses du virus de la paralysie chronique de l'abeille ( $7,4 \times 10^9$  copies/abeille). Cette charge est 100 000 fois plus élevée que celle observée sur des abeilles vivantes prélevées sur le même site. Il convient de noter que les abeilles vivantes portaient également des spores de *Nosema* spp, identifiées comme *Nosema cerenae*, au taux de  $1,66 \times 10^6$  spores/abeille.

Les rapports d'analyse mentionnent des traces de clothianidine dans les abeilles mortes, à hauteur de 0,473 ng/abeille. Comme précédemment sur le site de Hastings, cette dose ne permet pas d'imputer une origine chimique aux mortalités observées.

- **Site de Pau-Nord**

Sur ce site aucune mortalité qualifiée d'anormale n'a été observée (tableau 9). Les abeilles prélevées devant ces deux ruches portaient des spores de *Nosema* sp, identifiées comme *Nosema cerenae*, au taux de 0,84 et  $3,88 \times 10^6$  spores/abeille.

Les rapports d'analyse indiquent l'absence de résidus quantifiables de néonicotinoïdes.

## CONCLUSIONS

Les résultats des investigations réalisées au plan sanitaire et toxicologique afin d'identifier l'origine des mortalités observées dans 4 ruches des Pyrénées-Atlantiques ne sont pas concluants. Les examens pathologiques révèlent de façon assez régulière la présence du virus de la paralysie chronique dans les abeilles mortes, associé ou non à *Nosema cereanae*. Des travaux sont actuellement en cours qui visent à déterminer la charge virale du virus de la paralysie chronique associée à un état pathologique<sup>20, 21</sup>.

Les résidus de clothianidine quantifiés dans des abeilles mortes pour deux des ruches, à hauteur de 0,337 et 0,473 ng/abeille, sont très inférieurs à la dose sans effet de cette substance (2 ng/abeille après administration répétée) et ne permettent pas d'attribuer une origine chimique aux mortalités observées. Les résidus de thiaméthoxam quantifiés dans des pollens de trappes sur le site de Peyrehorade semblent indiquer la présence à proximité de ce site de parcelles ayant été semées avec du maïs traité avec la préparation Cruiser. Un descriptif précis, incluant la nature des cultures dans cette zone ainsi que les programmes phytosanitaires associés, n'étant pas disponible, il n'est pas possible d'attester cette hypothèse. Aucune trace de thiaméthoxam n'a cependant été relevée dans les abeilles mortes ou vivantes. L'hypothèse de la consommation de pollen contenant des résidus de thiaméthoxam comme pouvant être à l'origine des mortalités observées n'est donc pas retenue.

En conséquence, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que :

- les mortalités observées ne peuvent être imputées à la consommation par les abeilles de pollen présentant des résidus de thiaméthoxam ;
- les mortalités observées ne peuvent être imputées aux résidus de clothianidine retrouvés dans les échantillons d'abeilles analysées.

En l'absence d'informations recueillies sur le terrain relatives à l'environnement des ruches concernées, aux traitements phytopharmaceutiques des cultures environnantes et à la conduite apicole de ces ruches, il n'est pas possible de répondre à la question de l'origine des mortalités observées, ni d'expliquer la présence de résidus de néonicotinoïdes dans les échantillons de pollens et d'abeilles analysés.

**Pascale BRIAND**

**Mots-clés** : abeilles, néonicotinoïdes, pathologie

<sup>20</sup> Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. Ph. Blanchard, M. Ribière, O. Celle, P. Lallemand, F. Schurr, V. Olivier, A.L. Iscache, J.P. Faucon. *Journal of Virological Methods* 141 (2007) 7–13.

<sup>21</sup> Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. Olivier Celle, Ph. Blanchard, V. Olivier, F. Schurr, N. Cougoule, J. P. Faucon, M. Ribière. *Virus Research* 133 (2008) 280–284.