



Unité d'Entomologie fonctionnelle et évolutive

Eric Haubruge
Bach Kim Nguyen



Centre d'Analyse des Résidus en Traces

Edwin De Pauw
Jean-Pierre Thomé
Joëlle Widart

Rapport intermédiaire relatif à la subvention intitulée :
« Evaluation des facteurs de risque liés au dépérissement des
abeilles en Wallonie et leur implication sur les bonnes pratiques
agricoles ».

DGA/D31-1090

Sommaire

1. Contexte et généralités
2. Objectifs
3. Stratégie et méthodes
4. Tendances, faits principaux et perspectives
5. Difficultés rencontrées

1. Contexte et généralités

Les abeilles domestiques tiennent un rôle clef dans les écosystèmes terrestres. En effet, la majorité des phanérogames ne pourrait accomplir leur cycle de développement sans l'intervention des abeilles, qui participent de manière prépondérante à la pollinisation de nombreux végétaux. L'incidence de la pollinisation par les insectes est difficile à évaluer. Toutefois, dans nos régions, un tiers de notre alimentation est directement ou indirectement tributaire de l'activité des insectes pollinisateurs. Dans l'U.E., l'apport économique de ces insectes est estimé en moyenne à 4,7 milliards d'euros par an. Dans des pays comme la Belgique et la France, on a calculé que 20 % de la valeur de la production des cultures entomophiles (tournesol, arbres fruitiers, légumineuses, ...) reviennent aux Apoidea. Outre l'amélioration de la pollinisation de cultures, l'abeille domestique revêt de multiples intérêts dont le maintien de la diversité génétique, la production de miel, le rôle de bioindicateur et, en tant qu'être vivant, social de surcroît, elle constitue également un modèle biologique d'intérêt majeur.

Conscient de l'importance de ces hyménoptères, on ne peut donc rester insensible aux troubles dont elles sont victimes. Plusieurs rapports récents mettent en évidence des mortalités d'abeilles en France mais également en Wallonie. Toutefois, même si le problème est bien réel, aucune de ces études ne permet d'incriminer catégoriquement un facteur de risque précis.

Depuis 1998, en Wallonie, les apiculteurs et leurs associations mettent en avant des problèmes de « dépérissement » des abeilles. Ce phénomène serait lié à l'utilisation d'insecticides pour l'enrobage de semences et plus particulièrement l'imidaclopride. Les enquêtes réalisées par le SPF des matières premières (2000/2001) et par le CARI (2003) n'ont toutefois pas permis d'établir une relation formelle entre l'utilisation d'insecticides et les troubles observés chez les abeilles.

2. Objectifs de la subvention

- a) Dégager les facteurs de risques liés au dépérissement des abeilles en Wallonie
- b) Proposer un cahier des charges pour la mise en place de bonnes pratiques agricoles en Wallonie favorisant le maintien et le développement des pollinisateurs en vue d'une meilleure productivité et d'une meilleure qualité des produits.

3. Stratégie et méthodes

La stratégie est basée sur l'application d'un plan d'étude centré sur deux groupes principaux de facteurs potentiellement impliqués dans les troubles dont sont victimes les abeilles : les pesticides et l'environnement du rucher.

Sont également abordés les polluants organiques persistants (POP) dans l'environnement et les pathologies.

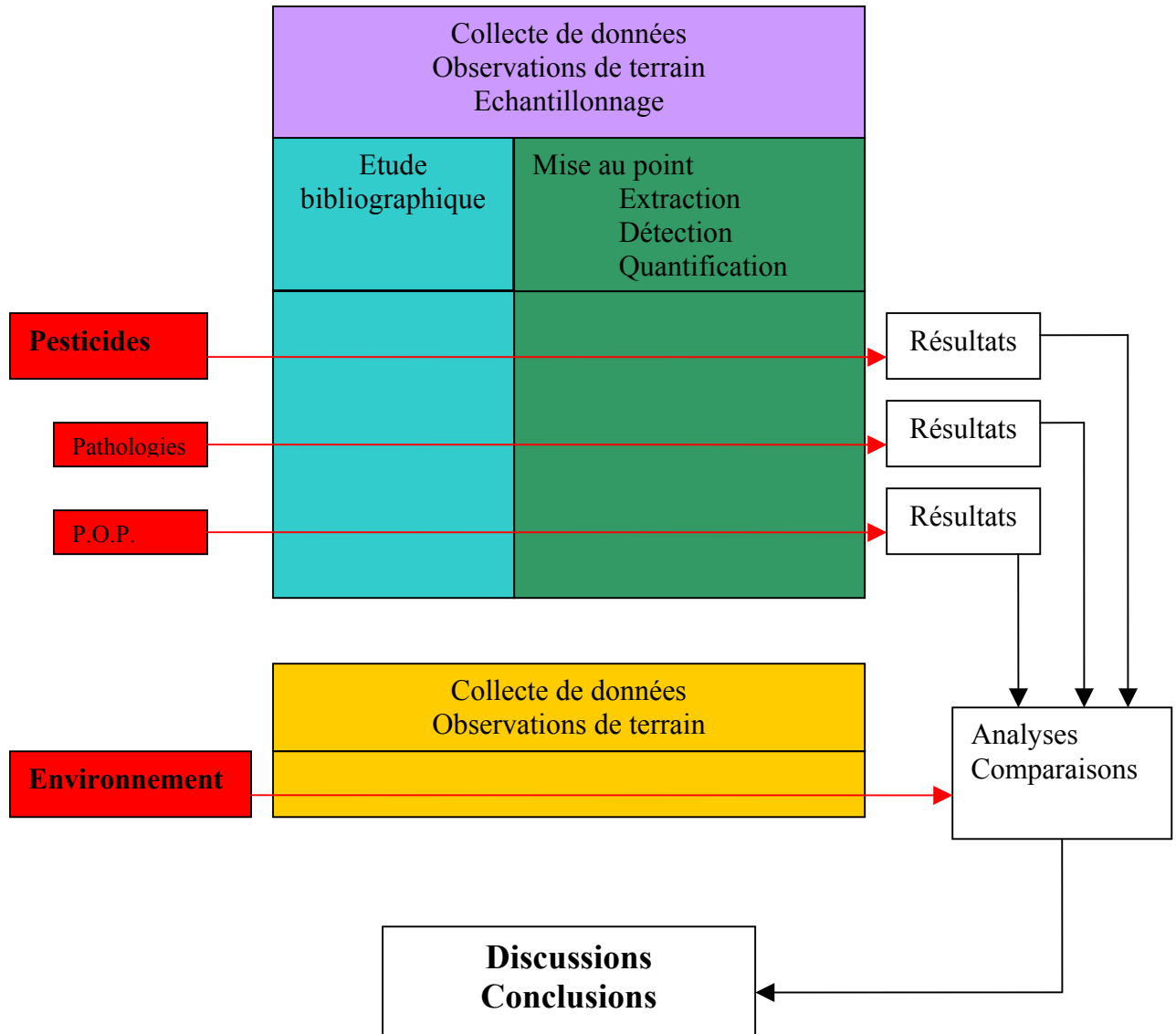


Figure 1 : Schéma de la stratégie appliquée à l'étude intitulée : « Evaluation des facteurs de risque liés au dépérissement des abeilles en Wallonie et leur implication sur les bonnes pratiques agricoles ».

La recherche des pesticides s'appuie sur la mise au point d'une méthode d'analyse veillant à obtenir un maximum de données analytiques par expérience. Ces données doivent être fiables à 100%. La méthode employée couple une technique de séparation chromatographique en phase gazeuse (GC) ou liquide (HPLC) et une technique de détection sensible et sélective, la spectrométrie de masse (CART-LSM).

Pour les POP (pesticides organochlorés), le LEAE (Laboratoire d'Ecologie animale et d'Ecotoxicologie) (CART-LEAE) assure les analyses en chromatographie en phase gazeuse à haute résolution et à l'aide d'un détecteur à capture d'électrons.

Les prises d'échantillons pour les analyses des pesticides et des POP sont effectuées bimensuellement.

Parallèlement, un questionnaire à l'attention des apiculteurs destiné à chiffrer le dépérissement des abeilles en Wallonie, à évaluer sa répartition et à mettre en évidence d'autres facteurs susceptibles d'influer sur la vitalité des abeilles a été rédigé et est diffusé.

Bien que la présente subvention ne devait pas permettre d'étudier de manière approfondie les maladies, notamment virales et bactériennes chez les abeilles, un état des lieux est réalisé à titre exploratoire. Au cours de la première année, des échantillons sont prélevés, stockés à -80°C, pour être sujets à une série d'expérimentations basées sur la méthode moléculaire d'identification par amplification par RT-PCR dans le cadre de travaux de fin d'études.

Les résultats issus des analyses ci-dessus seront finalement comparés et analysés avec les données collectées sur le terrain.

Au niveau des sites étudiés sont mensuellement effectués des observations devant et à l'intérieur des ruches, ainsi que des pesées.

Devant la ruche sont notamment recueillies comme informations : le niveau d'activité sur le plan de vol, le comportement de rejet d'abeille(s) vivante(s) ou morte(s) au trou de vol, l'activité de butinage, la réaction lors de contacts sur abeille par l'observateur, la présence d'abeille(s) rampante(s) ou tremblotante(s) devant la ruche, la présence d'abeille(s) à l'abdomen gonflé et induré, la présence de déjections sur la ruche et le plan de vol, des abeilles petites et déformées, etc.

Des bacs récupérateurs ont été placés devant les ruches. Les abeilles mortes s'y trouvant sont comptabilisées ainsi que les nymphes, le couvain plâtré ou d'autres arthropodes. Chaque individu est observé et décrit.

Dans les ruches, sont notamment collectées comme données le nombre de cadres, le nombre de ruelle(s) peuplées, le nombre de face(s) de cadre avec nectar, miel ou sucre de nourrissage, le nombre de face(s) de cadre avec pollen, le nombre de face(s) de cadre avec du couvain, la position du couvain sur les cadres, la présence de comportement ou d'observation(s) atypique(s) tel que moisissures, abeilles moribondes ou encore couvain plâtré dans les cellules.

4. Tendances, faits principaux et perspectives

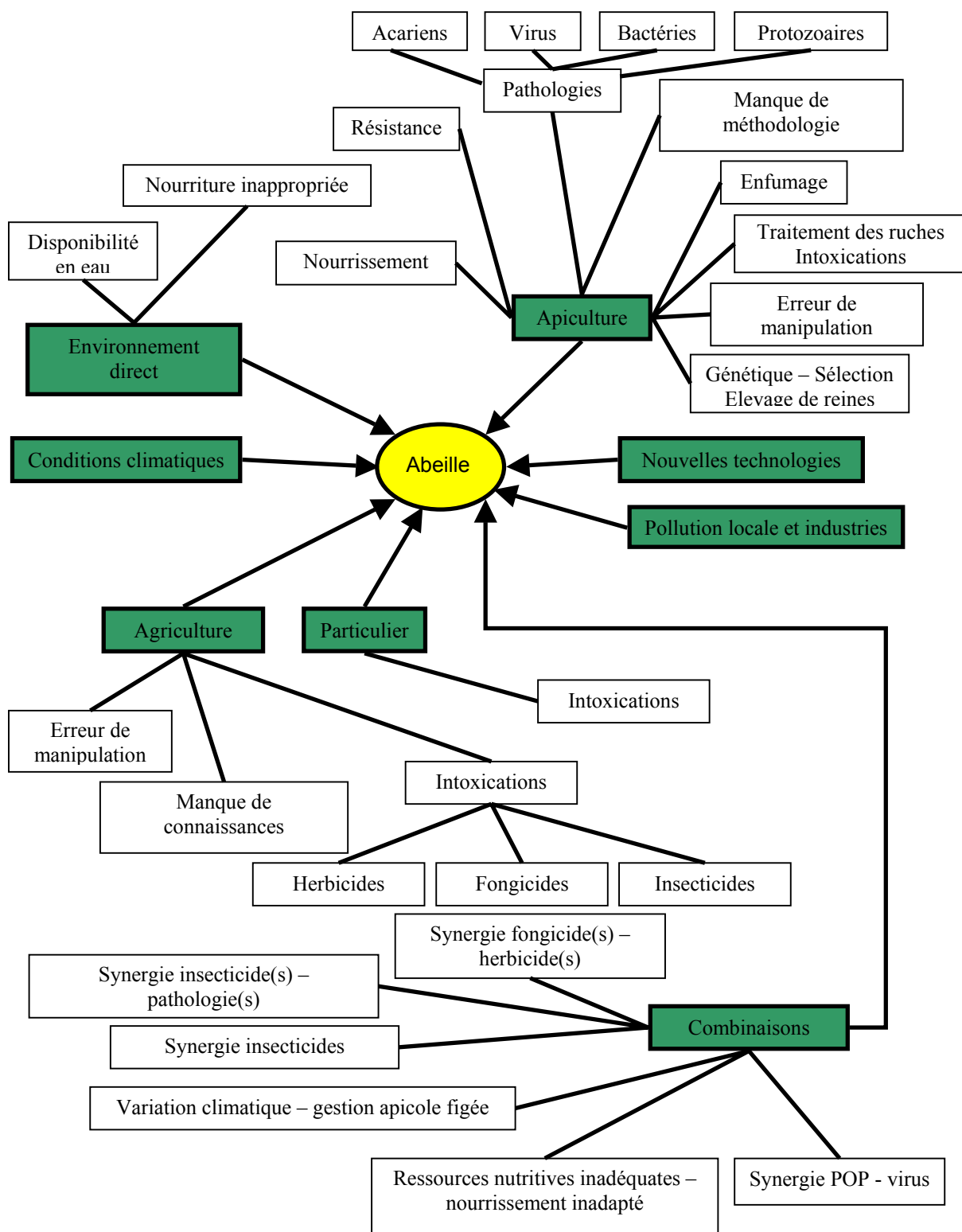


Figure 2 : Facteurs susceptibles d'influer sur la vitalité de l'abeille (*Apis mellifera* L.). Ils résultent des recherches bibliographiques, des réunions réalisées, de la communication avec les apiculteurs et des observations de terrain. Cette figure n'est pas figée et peut évoluer.

A. Tendances

Les tendances sont, à l'heure actuelle, issues du questionnaire, des observations de terrain et des mises au point des différentes méthodes d'analyse prises en compte individuellement sans comparaison.

Le questionnaire diffusé auprès des apiculteurs est un support destiné à collecter un maximum d'informations sur leur(s) rucher(s) entre l'ouverture des ruches 2004 et l'ouverture des ruches 2005. A l'heure actuelle, il est indicatif.

Le pourcentage moyen de perte dans les ruchers qui ont été sondés jusqu'alors est de 29%. Les pourcentages de mortalité des ruches sont différents selon les traitements anti-varroa qui leurs sont appliqués. Ainsi, parmi les ruches traitées avec une formulation contenant de l'amitrazé, du fluvalinate, de la roténone ou dans les ruchers où un test tolérance est appliqué sur une partie des ruches, on a respectivement des pourcentages de mortalité de 10,9%, 60%, 48% et 50% des ruches.

Il existe un grand nombre de produits non agréés utilisés contre la varroase. Les dates et le nombre de traitement(s) sont très variables d'un apiculteur à l'autre, ainsi que chez le même apiculteur d'une année à l'autre. Après le nourrissage, tous les apiculteurs n'effectuent pas de suivi hivernal, il est donc difficile de dater clairement la mort des ruches entre novembre et mars. Une mortalité plus importante a été constatée dans les ruches ayant été très peuplées durant la saison estivale.

Les observations sur le terrain nous ont permis de constater que l'acarien *Varroa destructor* est présent dans toutes les ruches étudiées, que la loque américaine (*Paenibacillus larvae*), maladie à déclaration obligatoire et réputée contagieuse, est présente en Wallonie.

Nous avons également constaté que le froid était très souvent, en hiver, responsable du coup de grâce des ruches faibles. En effet, on retrouve, après l'hiver, dans la plupart des ruches mortes, un amas d'abeilles concentré sur une surface d'environ 10 centimètres et qui, compte tenu de leur faible nombre, n'ont pu maintenir une température de 35-36°C nécessaires au bon développement du couvain et donc au renouvellement des abeilles. On soulignera également que des ruches faibles mais vivantes au début du mois de février n'ont pu résister à la chute de température de la fin du mois.

Les comptages et mesures réalisés montrent que depuis l'ouverture des ruches 2005, c'est-à-dire depuis le mois de mars 2005, on observe une diminution de poids des 2/3 des ruches étudiées, ainsi qu'une diminution de la quantité de pollen, de la nourriture, de la population et une très faible augmentation du couvain dans près d'un tiers des ruches.

De manière générale, les symptômes observés dans les ruches moribondes (couvain en mosaïque, abeilles aux ailes atrophiées, abeilles rampantes, abeilles tremblotantes, abeilles aux ailes écartées, couvain positionné sur la partie supérieure des ruches et donc mauvaise organisation de la ponte, déjections importantes, moisissures, présence d'abeilles mortes ou de couvain plâtré dans des cellules, etc.) peuvent être corrélées aux comptages et mesures récoltés.

Pour les analyses de pesticides, le calendrier indique que la première année est consacrée à la mise au point de la méthode. Celle-ci est subdivisée en trois étapes.

- Détection : les pesticides sont détectés au moyen de deux spectromètres de masse (GC-MS et LC-MS/MS). (Réalisation de juin 2004 à novembre 2004).
- Extraction : la méthode est en cours de finalisation, pour les deux systèmes, il s'agit d'une extraction-purification sur colonne ChemElut (Varian inc.). Le développement de

l'extraction sur les abeilles est toujours en cours, aucun résultat ne peut être montré pour l'instant (Réalisation de novembre 2004 à juin 2005).

- Quantification et interprétation : Les tests de quantification sont réalisés en parallèle au développement de l'extraction. Selon la Recommandation de la Commission Européenne du 3 mars 1999 (L128, pp25-55), une droite réalisée sur la matrice doit accompagner les échantillons et permettre la quantification des pesticides (Réalisation novembre 2004 juin 2005). Les rendements d'extraction doivent se situer entre 70 et 110%.

Au total, selon les matrices, environ cinquante matières actives sont étudiées.

La deuxième année du projet sera essentiellement consacrée à l'analyse des échantillons prélevés sur site. Au début de la deuxième année, la méthode GC-MS sera transposée sur un spectromètre de masse de type Ion Trap. Les limites de détection devraient être diminuées sur ce type d'appareillage. La séparation sur colonne GC est déjà établie, le gain se situera dans le passage à deux dimensions lors de la fragmentation des ions. Les concentrations de dopage des points de la courbe pourront être diminuées.

L'extraction et la détection des polluants organiques persistants dans la matrice abeille sont en cours de réalisation. Depuis le début du mois de mars 2005, plusieurs séries d'analyses de mise au point ont été réalisées en se basant sur une méthode validée sur les poissons (MB/08/Poisson), puis nous avons adapté cette méthode aux contraintes de la matrice abeille. Trente molécules sont recherchées avec parmi elles, des PCBs, le lindane ou le DDT. Jusqu'à présent, 11 molécules de PCBs ont été détectées dans une gamme de concentrations s'étalant de 0,43 à 17,45 ppb dans des échantillons frais, ainsi que deux molécules d'organochlorés (lindane et pp'DDD) retrouvées entre 0,18 et 1,24 ppb. Sept molécules de PCBs et 2 d'organochlorées ont été détectées dans le même échantillon. Ces données sont en cours de validation.

La partie exploratoire des différentes pathologies de l'abeille domestique est essentiellement basée sur les observations de terrain et sur l'utilisation systématique de kits de détection commerciaux. Une méthode de laboratoire, couplant la mise en culture et des techniques de biologie moléculaire, est en phase de mise au point et employée pour la détection de maladies bactériennes et virales.

Les données relatives à l'environnement sont issues des observations de terrain et traitées à l'aide du logiciel Arcview. Un courrier a été adressé à Monsieur le Directeur J.P. Rousseau (Direction Générale de l'Agriculture) lui demandant de disposer des occupations des terres agricoles en terme de culture (maïs, froment, pomme de terre,...) depuis 1999 sur les différents sites étudiés.

B. Faits principaux

- La mise en place de l'étude (sélection des ruchers, mise en place du dispositif d'observation et d'échantillonnage, réalisation d'un calendrier de terrain)
- Une réunion d'information à l'attention des apiculteurs le 17 Juillet 2004 afin de leur présenter l'étude
- Un article faisant le point sur le dépérissement des abeilles en Wallonie
- Un article de présentation de l'étude à l'attention des apiculteurs
- La mise au point des méthodes d'extraction et de détection des pesticides et des POP dans les différentes matrices
- Le suivi des ruchers (Echantillonnages, comptages, mesures, symptomatologie, etc.) et le début de la partie exploratoire consacrée aux pathologies
- Une réunion avec les membres du groupement ALARME le 1^{er} février 2005 afin de leur présenter l'état d'avancement du projet et d'avoir leur avis dans le but de pouvoir être le plus objectif possible dans notre étude
- Un article destiné à prévenir les apiculteurs de la présence de maladie à déclaration obligatoire en Wallonie pour leur permettre de prendre les précautions qui s'imposent
- Rencontre avec les membres de l'équipe de l'AFSSA de Sophia-Antipolis le 28 février 2005
- Trois articles ou encarts de soutien du monde apicole.

C. Perspectives

- Réunion le 7 Juin 2005 à l'attention des apiculteurs
- Finir la mise au point de la quantification des pesticides et des POP dans les différentes matrices
- Poursuivre les observations de terrain et les échantillonnages
- Explorer plus avant les pathologies dans les limites du possible
- Effectuer les analyses relatives aux pesticides en routine
- Comparer les résultats des analyses avec les comptages, mesures et observations de terrain
- Diffuser le questionnaire à plus grande échelle
- Proposer un cahier des charges pour la mise en place de bonnes pratiques dans le monde agricole.

5. Difficultés rencontrées

Trois principales difficultés sont rencontrées dans ce projet.

En effet, la présente étude est basée essentiellement sur les pesticides et l'environnement direct du rucher, les maladies ne devaient y être incluses que sous forme d'approche exploratoire. Or les observations sur le terrain nous ont permis de constater la présence de maladies et notamment des pathologies à déclaration obligatoire en Wallonie. Dans ce contexte, les pathologies devraient être considérées dans cette étude au même titre que les pesticides et les POP de manière à ne pas passer à côté d'un facteur ou d'une éventuelle combinaison de facteurs incluant des pathologies.

Cela peut être expliqué par différentes hypothèses : lacunes en matière de diagnostic de pathologies, les assistants apicoles ont parfois une formation insuffisante, empirisme et peu de méthodologie parfois chez les apiculteurs, difficulté de rassembler des informations objectives et exploitables, beaucoup de fédérations et de sections différentes entre lesquelles le dialogue est parfois difficile (manque de communication, avis contradictoires, ...).

Les apiculteurs semblent livrés à eux-mêmes. En effet, au cours de nos contacts avec les apiculteurs certains nous ont fait part de leur regret face à un manque d'aide logistique.

La présence de maladies a imposé des mesures sanitaires plus drastiques lors des visites de terrain.

La seconde difficulté est liée à la première : elle concerne le maintien ou non de l'anonymat des participants à l'étude dont les ruchers seraient contaminés par des maladies à déclaration obligatoire ou des matières actives interdites en Belgique.

La troisième difficulté rencontrée est la quasi-impossibilité de suivre un calendrier prédéterminé au jour près car l'opportunité de prélèvements et d'observations est directement liée aux conditions climatiques.

Lors des visites de ruchers, nous sommes souvent critiqués car notre approche est multifactorielle et ne s'arrête pas à l'étude unique de l'imidaclopride et des insecticides systémiques.

Justification de notre démarche :

A l'heure actuelle le dépérissement des abeilles en Wallonie a été peu étudié ou a été focalisé sur les pesticides. Malheureusement, les résultats émergeant en Wallonie, comme à l'étranger, sont très divergents et concrètement aucune conclusion ne peut aujourd'hui être tirée.

Si notre étude prend en compte l'ensemble des facteurs susceptibles d'influer sur la vitalité des abeilles, c'est pour éviter de passer à côté de la ou des causes impliquées dans les troubles dont sont victimes les abeilles.