



**HAL**  
open science

# Toxicologie comparée de deux classes d'insecticides : un organophosphore le fénitrothion et un pyréthriinoïde "la cyperméthrine" chez l'abeille mellifère (*Apis mellifera mellifera*. L.) : études au laboratoire et sur le terrain

Najib Bendahou

## ► To cite this version:

Najib Bendahou. Toxicologie comparée de deux classes d'insecticides : un organophosphore le fénitrothion et un pyréthriinoïde "la cyperméthrine" chez l'abeille mellifère (*Apis mellifera mellifera*. L.) : études au laboratoire et sur le terrain. Toxicologie végétale et mycotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1994. Français. NNT : 1994METZ049S . tel-01776800

**HAL Id: tel-01776800**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776800>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ACADEMIE DE NANCY-METZ

UNIVERSITE DE METZ

THESE

Présentée au Centre des Sciences de l'Environnement pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT D'UNIVERSITE

Spécialité: TOXICOLOGIE

Option: TOXICOLOGIE DE L' ENVIRONNEMENT

**TOXICOLOGIE COMPAREE DE DEUX CLASSES D'INSECTICIDES:  
UN ORGANOPHOSPHORE "le fénitrothion" ET UN PYRETHRINOIDE  
"La cyperméthrine" CHEZ L'ABEILLE MELLIFERE (*Apis mellifera  
mellifera. L.*). RECHERCHES AU LABORATOIRE  
ET SUR LE TERRAIN.**

Par

**Najib BENDAHOU**

Soutenue le 7 Octobre 1994 devant le jury composé de MM:

**P. VASSEUR:** (Professeur de Toxicologie, C. S. E , Metz)

Président

**R. MOREAU:** (Professeur de Physiologie, Bordeaux I)

Rapporteur

**G. BONIN:** (Professeur d'Ecologie, Marseille)

Rapporteur

**M. BOUNIAS:** (Prof

Examinateur

**C. FLECHE:** (Doct

Examinateur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420507 4

ub 81652

ACADEMIE DE NANCY-METZ

UNIVERSITE DE METZ

THESE

Présentée au Centre des Sciences de l'Environnement pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT D'UNIVERSITE

Spécialité: TOXICOLOGIE

Option: TOXICOLOGIE DE L' ENVIRONNEMENT

**TOXICOLOGIE COMPAREE DE DEUX CLASSES D'INSECTICIDES:  
UN ORGANOPHOSPHORE "le fénitrothion" ET UN PYRETHRINOIDE  
"La cyperméthrine" CHEZ L'ABEILLE MELLIFERE (*Apis mellifera  
mellifera. L.*). RECHERCHES AU LABORATOIRE  
ET SUR LE TERRAIN.**

Par

**Najib BENDAHOU**

Soutenu le 7 Octobre 1994 devant le jury composé de MM:

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1994/1475
Cote	S/M3 94/49
Loc	Magasin

**P. VASSEUR:** (Professeur de Toxicologie, C. S. E , Metz)  
**R. MOREAU:** (Professeur de Physiologie, Bordeaux I)  
**G. BONIN:** (Professeur d'Ecologie, Marseille)  
**M. BOUNIAS:** (Professeur de Toxicologie, Avignon)  
**C. FLECHE:** (Docteur-vétérinaire, CNEVA, Sophia-Antipolis)

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

DOCTORAT NOUVEAU REGIME

(Arrêté du 30 Mars 1992)

*À ma mère, pour son immense amour et ses incessants encouragements*

*À mon défunt père, sans qui ce travail n'aurait jamais été accompli*

*À toute ma famille*

*Je suis sensible à la présence dans ce jury Melle **Paule VASSEUR**, qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame **Cécile FLECHE** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de pathologie des petits ruminants et des abeilles au CNEVA/Sophia-Antipolis, et pour sa grande disponibilité et ses conseils éclairés.*

*J'exprime mes plus sincères remerciements à Monsieur **Michel BOUNIAS** pour avoir accepté de diriger et juger ce travail, et d'avoir veillé sur la progression et la réalisation de cette thèse.*

*Que Monsieur **Robert MOREAU**, veuille bien trouver ici l'expression de ma vive reconnaissance pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger et de critiquer ce travail, et d'avoir porté un regard bienveillant sur la réalisation de cette thèse.*

*Je tiens à remercier vivement Monsieur Giles BONIN qui a bien voulu juger ce travail, je lui exprime ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie vivement le **CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES**, pour m'avoir permis financièrement de mener à bien ce travail.*

*Je remercie vivement Messieurs **J. P. FAUCON** et **P. DRAJNUDEL**, pour l'aide importante qu'ils m'ont apportée pour leur collaboration dans certaines expérimentations.*

*Et*

*que toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail soient ici remerciées.*

**AVANT PROPOS**

### **AVANT PROPOS**

Suite à l'enquête écopathologique entreprise au laboratoire de Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles (**LPPRA**), rattaché au Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (**CNEVA**) à Sophia-Antipolis (FLECHE *et al.*, 1985), un programme de recherches a été mis en place afin d'élucider l'affaiblissement du cheptel apicole. A ce sujet, des études d'écotoxicité de deux insecticides (la cyperméthrine et le fénitrothion) fréquemment retrouvés dans les analyses, ont été entreprises à deux niveaux:

1-Au laboratoire, on procédera d'abord à l'évaluation comparative de la toxicité des deux insecticides à l'aide d'un nouveau concept algébrique, puis à l'étude de l'impact de doses sublétales sur les perturbations biochimiques de l'abeille.

2-Sur le terrain, on évaluera les perturbations qui surviennent dans un cheptel apicole soumis à un nourrissage continu au sirop de saccharose, contaminé par une dose sublétale de cyperméthrine.

## Abréviations et symboles

ab	abeille
AChE:	Acétylcholinestérase
ADP:	Adénosine diphosphate
AMP:	Adénosine monophosphate
AcSCh:	Acétylthiocholine iodée
ATP:	Adénosine triphosphate
ATPase:	Adénosine triphosphatase
DDT:	Dichloro-diphényl-trichloréthane
DL50:	Dose létale qui entraîne 50% de mortalité dans une population au temps t
dT50:	Dose en , pour laquelle le temps nécessaire pour observer 50% de mortalité est réduit de moitié.
DTNB:	Acide bis-dithio 5, 5'-nitro 2-benzoïque
EDTA:	Ethylène diamine-tetraacétique
I:	Indice d'occupation des cadres par les réserves
KD	Knock Down
Ln:	Logarithme népérien
min:	minutes
NAD(H):	Nicotinamide dinucléotide réduit
NC:	Nombre de cadre à couvain d'une ruche
NEDIAC:	N-(Naphtyl-1) éthylène-diamine, dichlorohydrate
nmole/ab	nanomole/abeille
NT:	Nombre total de cadre d'une ruche
$n_t$ :	Coefficient de Hill de la relation mortalité / temps
PA:	Principe actif
PEP:	Phosphoénolpyruvate
SAB:	Serum Albumine Bovin
TEPP:	Tetraéthyl-pyrophosphate
TL50:	Temps létal au bout duquel on obtient 50% de mortalité des individus
TRIS:	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
VPC:	Virus de la Paralysie Chronique
$\Delta$ :	Vitesse de mortalité des abeilles en %/jour

## SOMMAIRE

	Page
<b>I-INTRODUCTION</b>	13
<b>II-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	16
<b>A-HISTORIQUE</b>	17
<b>B-DESCRIPTION DES INSECTICIDES TESTES</b>	17
1-Les pyréthriinoïdes	17
2-Les organophosphorés	24
<b>C-L'ABEILLE MELLIFERE</b>	34
1-Systématique	34
2-Biologie	34
3-Organisation sociale des abeilles	38
4-Rôle de l'abeille dans l'environnement	39
<b>D-EFFET DES PESTICIDES SUR LES ABEILLES</b>	40
<b>III-MATERIELS ET METHODES</b>	42
<b>A-AU LABORATOIRE</b>	43
1-Matériel chimique	44
2-Matériel Biologique	44
3-Mode opératoire	46
4-Méthodes d'évaluation de la toxicité sur <i>Apis mellifera</i>	49
5-Evaluation des perturbations biochimiques	55
<b>B-SUR LE TERRAIN</b>	65

1-Objectif	67
2-Matériels	67
3-Caractéristiques générales du site expérimental	69
4-Méthodologie	73
5-Les interventions sur le terrain	76
6-Observation des perturbations du développement larvaire	79
7-Données climatiques	81
8-Les analyses statistiques	83
<b>IV-RESULTATS</b>	<b>86</b>
<b>A-EVALUATION DE LA TOXICITE AU LABORATOIRE</b>	<b>87</b>
1-Toxicité aiguë	88
1.1-Résultats	88
1.2-Discussion	91
2-Evaluation de la toxicité chronique selon la méthode de Bounias dérivée de` l'équation de "Hill"	96
<b>B-ACTION DES LA CYPERMETHRINE ET DU FENITROTHION SUR LE METABOLISME DE L'ABEILLE</b>	<b>113</b>
1-Effet de la cyperméthrine et du fénitrothion sur le métabolisme glucidique	115
1. 1-Résultats	115
1. 2-Discussion	120
2-Effet comparé de la cyperméthrine et du fénitrothion sur l'activité Cholinestérasique et ATPasique	124
2.1-Résultats	124
2. 2-Discussion	128

**C-EFFET D'UNE DOSE SUBLETALE DE LA CYPERMETHRINE SUR LE TERRAIN**

1-Résultats	131
2-Discussion	150

**V-CONCLUSION GENERALE** 162**VI-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 168**VII-ANNEXES** 184

<b>Annexe 1:</b> Tableau résumant l'évolution du tréhalose et du glucose en chez l'abeille suite à une intoxication à la cyperméthrine et au fénitrothion	185
---	-----

<b>Annexe 2:</b> Tableau résumant l'évolution de la surface alvéolaire chez le lot traité à la cyperméthrine et les lots témoins durant l'essai sur le terrain	188
--	-----

<b>Annexe 3:</b> Tableau des paramètres décrivant l'évolution générale des ruches	193
---	-----

<b>Annexe 4:</b> Tableau récapitulatif des paramètres climatiques relevés sur le site	195
---	-----

<b>Annexe 5:</b> Accord pour publication dans	197
---	-----

*1-Journal of Occupational Medicine and Toxicology*

<b>Annexe 6:</b> Articles soumis pour publication dans les journaux:	199
--	-----

<i>2-Crop Protection</i>	200
--------------------------	-----

<i>3-Toxicology letters</i>	201
-----------------------------	-----

<i>4-Environmental Entomology</i>	202
-----------------------------------	-----

**I-INTRODUCTION**

## I-INTRODUCTION

Depuis quelques années, de nombreuses intoxications d'abeilles ont été attribuées à tort ou à raison à certaines familles d'insecticides. Ces produits ont été plus particulièrement incriminés après pulvérisation sur colza, une plante reconnue pour ses qualités mellifères (LAMARTYN, 1988). Les opinions se sont partagées à ce sujet. Certains mettent l'accent sur la toxicité au laboratoire, d'autres considèrent surtout l'effet sur le terrain: c'est ainsi que BOS & MASSON (1983) malgré une toxicité importante mise en évidence au laboratoire, estiment que l'effet répulsif rend ces produits inoffensifs vis à vis des abeilles. Cet effet répulsif étant transitoire, le risque d'intoxication par des doses sublétales reste réel dans la mesure où les produits sont véhiculés par l'eau, le nectar et le pollen que les abeilles ramènent à la ruche (NAZAROV, 1969 ; DAVID, 1985 ; BARKER & WALLER, 1978 ; BARKER *et al.*, 1980 ; POLLET, 1987). Pour évaluer l'importance du problème, il convient de rappeler ici le rôle des abeilles. Outre les avantages des différents produits de la ruche dont les vertus médicinales sont incontestées (DUNADIEU, 1976 ; ALEXANDROV & DANILOV, 1975 ; COLIN, 1981 ; MARY, 1981), l'abeille est un auxiliaire d'une importance capitale dans l'agriculture. En effet suite à la diminution progressive du nombre des insectes pollinisateurs sauvages, l'abeille représente aujourd'hui à elle seule 90% de la faune pollinisatrice en Europe (BARBIER, 1986). La valeur de ses services rendus dans la pollinisation dépasserait de 10 à 15 fois la valeur des produits de la ruche. Ces arguments brièvement évoqués, mettent donc en évidence l'intérêt d'examiner la toxicité des pesticides sur les abeilles. L'objectif principal de notre recherche, sera donc d'étudier comparativement l'action de deux classes d'insecticides administrés à des doses sublétales, au laboratoire puis sur le terrain, afin de dégager les éventuels effets à long terme sur le développement du cheptel apicole. Nos travaux porteront sur deux familles d'insecticides, les organophosphorés représentés par le fénitrothion, et les pyréthrinoides par la cyperméthrine. Ces deux produits ont été retenus en raison de

la fréquence de leur mise en évidence au cours des enquêtes écopathologiques menées par le laboratoire CNEVA-LPPRA (FLECHE *et al.*, 1985 ; FLECHE, 1986).

Dans un premier temps des essais seront menés au laboratoire pour mieux connaître la toxicité des deux insecticides. Ces essais se dérouleront selon les étapes suivantes:

**1-essais normalisés de toxicité aiguë et chronique pour établir les relations dose-mortalité.**

**2-évaluation et comparaison de la toxicité des deux insecticides à l'aide d'une nouvelle méthode dérivée de l'équation de Hill.**

**3-action des concentrations sublétales sur le métabolisme de l'abeille au laboratoire.**

**4-enfin nous procéderons à des essais sur le terrain afin d'étudier l'effet d'une concentration sublétale sur le comportement des colonies et l'évolution du couvain. Au fur et mesure de l'avancement des travaux nous nous sommes rendu compte que pour des questions pratiques et de temps, il était impossible de mener de front sur le terrain l'essai des deux insecticides puisque, les préparatifs "anté essai" demandent un an et demi. De ce fait les essais sur le terrain n'ont été réalisés que sur la cyperméthrine qui avait été l'une des pyréthrinoïdes les plus fréquemment détectées durant le décryptage des échantillons de l'enquête écopathologique (FLECHE *et al.*, 1985).**

## **II-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

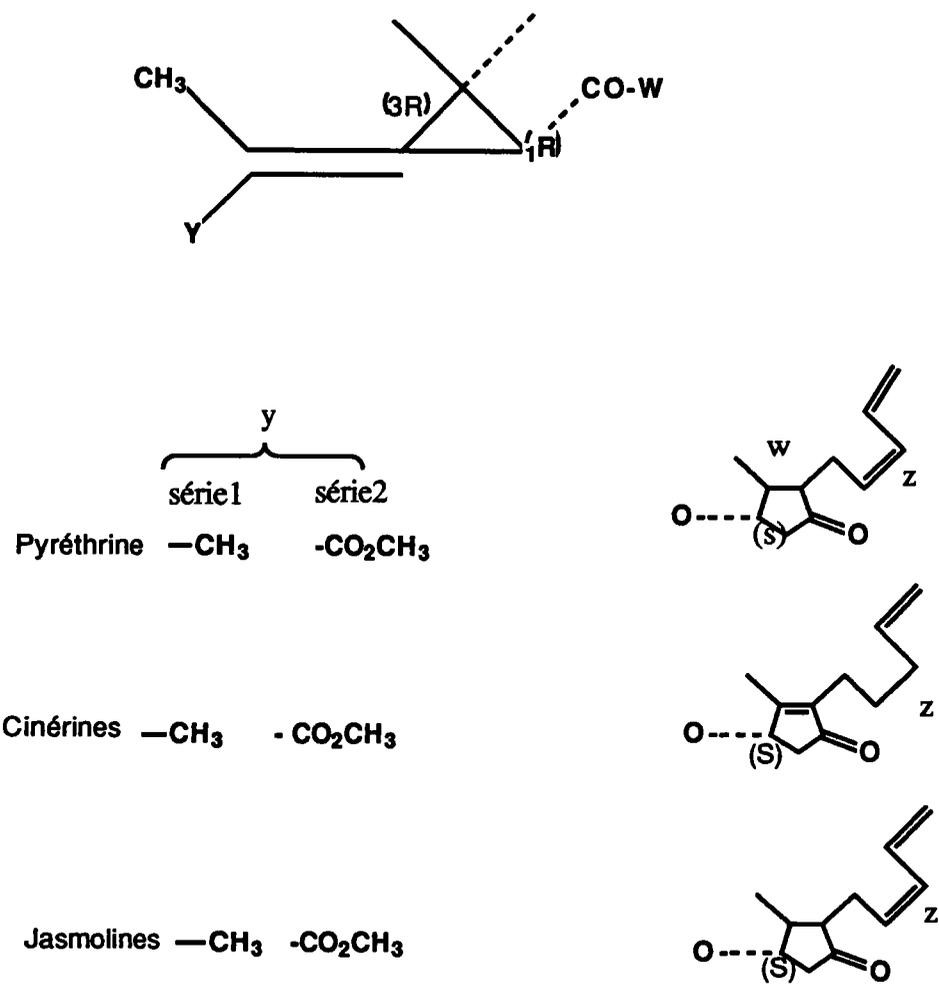
## **A-HISTORIQUE**

L'utilisation des substances toxiques contre les insectes nuisibles n'est pas une caractéristique du XXème siècle. Les premières armes contre les insectes dérivent du règne végétal. Il y a 2000 ans, les Chinois se seraient servis des extraits de pyrèthre pour tuer les puces et les poux. Les insecticides d'origine végétale les plus connus, encore utilisés, sont les pyrèthrines naturelles. Toutefois, c'est du monde minéral qu'allèrent naître les premiers insecticides agricoles utilisés à grande échelle, les arsenicaux (arséniates de plomb et de calcium), les fluorures (fluorosilicates de baryum) et le soufre.

Mais dès la fin du XIXème, une troisième génération d'insecticides se développa: les insecticides organiques de synthèse (chloropicrine 1907, thiocyanates 1932). En 1939 les suisses MÜLLER et MIESMANN, firent une découverte capitale, celle du dichloro-diphényl-trichloroéthane connu sous le nom de D.D.T. symbole d'efficacité dans le domaine de la lutte contre les insectes. A partir de ce moment, le développement des insecticides organiques de synthèse fut très rapide.

## **B-DESCRIPTION DES INSECTICIDES TESTES**

**1-Les pyrèthrinoïdes:** L'évolution de la grande famille des pyrèthrinoïdes a pour origine l'observation des propriétés insecticides des extraits de fleurs de pyrèthre. Ces extraits sont très efficaces sur de nombreux insectes, mais ils présentent un inconvénient: une forte instabilité à la lumière. Partant de la structure chimique de ces composés naturels, on est arrivé enfin à la synthèse de dérivés photostables. Les pyrèthrinoïdes sont peu rémanents et puissants à faibles doses, de sorte qu'aujourd'hui ils sont en pleine expansion (MARTEL, 1980)



**Figure 1:** les principaux esters du pyrèthre d'après TESSIER (1982)

### **1.1-Du pyrèthre aux pyréthrinoïdes photostables.**

Les effets toxiques de la poudre de fleurs de pyrèthre ont été décrits pour la première fois en Chine populaire.

Famille: Composées

genre: *Chrysanthemum*

Seulement deux espèces ont été reconnues comme ayant des propriétés insecticides, *Chrysanthemum roseum* et *Chrysanthemum cinerariæfolium*. Nous savons aujourd'hui que les propriétés de cette poudre sont dûes à la présence de 6 esters étroitement apparentés (Fig.1).

### **1. 2-Mode d'action des pyréthrinoïdes (CARLE, 1985 ; MULLER & SALGADO, 1985)**

Les modalités qui règlent l'action des pyréthrinoïdes sont complexes. Les controverses qu'elles suscitent portent d'une part, sur le processus d'intoxication responsable des différents symptômes cliniques, et d'autre part sur la nature des sites d'action.

#### **1. 2. 1-Phénomène d'abattement ou" Knock-Down" (KD)**

Les symptômes de prostration et de paralysie sont consécutifs au blocage des nerfs périphériques. GAMMON (1978) montre que l'alléthrine provoque une hyperactivité du système nerveux périphérique de la blatte. OSBORNE (1982) indique que les organes sensoriels sont des cibles plus vulnérables que les jonctions neuromusculaires, et selon VAN DER BECKEN (1974), chez la grenouille, l'abattement est précédé avant tout d'un effet direct sur les nerfs efférents. HELLING (1984) après ses travaux sur la blatte américaine, confirme la faible réactivité du système nerveux central et mentionne que seules des doses très élevées déterminent un accroissement significatif de l'activité nerveuse au moment de l'apparition des symptômes. Donc l'abattement (KD) traduit bien une activité toxique par voie périphérique.

## **1. 2. 2-Effet létal ou "KILL"**

Rien ne permet de postuler que les conséquences d'un "KD" périphérique aboutissent à la mort de l'insecte. En revanche, l'effet létal suit un abattement et une période de prostration plus au moins longue. Les pyréthri-noïdes, composés très lipophiles, sont dissous d'abord dans la couche cireuse externe de la cuticule avant de se répartir dans les couches profondes moins polarisées. La pénétration tégumentaire, s'effectue aussi bien à travers des canalicules cireux qui forment un réseau anastomosé, que par les revêtements lipophiles trachéens accessibles par les spiracles (NOBLE-NESBIT, 1970). Le transit et la distribution des pyréthri-noïdes dans l'organisme animal, se font par l'hémolymphe (BURT & GOODCHILD, 1971). L'accumulation progressive se fait dans le corps adipeux et la corde nerveuse, mais leurs taux restent toujours plus élevés dans l'hémolymphe. En somme, une très faible proportion du toxique aboutit réellement sur les cibles réactives pour déterminer la véritable activité nerveuse du produit, suivie par une séquence normale d'intoxication et un effet d'abattement, puis selon la dose par une phase de récupération ou la mort.

## **1. 3-Effet des pyréthri-noïdes sur le système nerveux**

### **1. 3. 1-Niveau membranaire:**

NARAHASCHI (1980) trouve qu'aux faibles concentrations, les pyréthri-noïdes entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions ( $\text{Na}^+$ ) au niveau du corps cellulaire, de l'axone et de la dendrite. Cette augmentation est due à une prolongation d'ouverture des canaux à sodium qui provoque un accroissement d'amplitude et de durée du potentiel de dépolarisation. Par contre aux fortes concentrations les pyréthri-noïdes cyanés bloquent totalement la perméabilité membranaire. Toutes ces modifications électrophysiologiques sont thermodépendantes négatives. OSBORNE (1982), conclut que les sites pyréthri-noïdes au sein des canaux sodiques sont localisées au niveau de la porte d'activation et de la porte d'inactivation du canal  $\text{Na}^+$ .

### 1. 3. 2-Action sur les ATPases

La littérature à ce sujet est très riche. Les pyréthriinoïdes sont des inhibiteurs incontestés de l'activité ATPase ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{k}^+$ )-dépendante, mécanisme enzymatique de la pompe à sodium qui favorise l'hydrolyse de l'ATP, et par ce biais génère l'énergie nécessaire au maintien du gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane (CHENG & CUTKOMP, 1972 ; DESAIAH *et al.*, 1975 ; CLARK & MATSUMURA, 1982 ; ASHELISHA & SIVAKUMAR, 1989 ; JONES & LEE, 1986). Les pyréthriinoïdes inhibent également l'ATPase à  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (ASHELISHA & SIVAKUMAR, 1989), cette enzyme fournit l'énergie nécessaire à la pompe à calcium.

### 3. 3. 3-Action hormonale

La bioresméthrine au contact des cellules des corpora cardiaca induit la formation de larges vacuoles dans le soma et une exocytose intensive dans les terminaisons nerveuses. Les pyréthriinoïdes agissent sur les membranes excitables des corps des neurones par induction d'activité répétitive et blocage de la transmission des potentiels d'action (SINGH, 1982 ; SINGH & ORCHARD, 1983).

### 1. 4-Métabolisme des pyréthriinoïdes

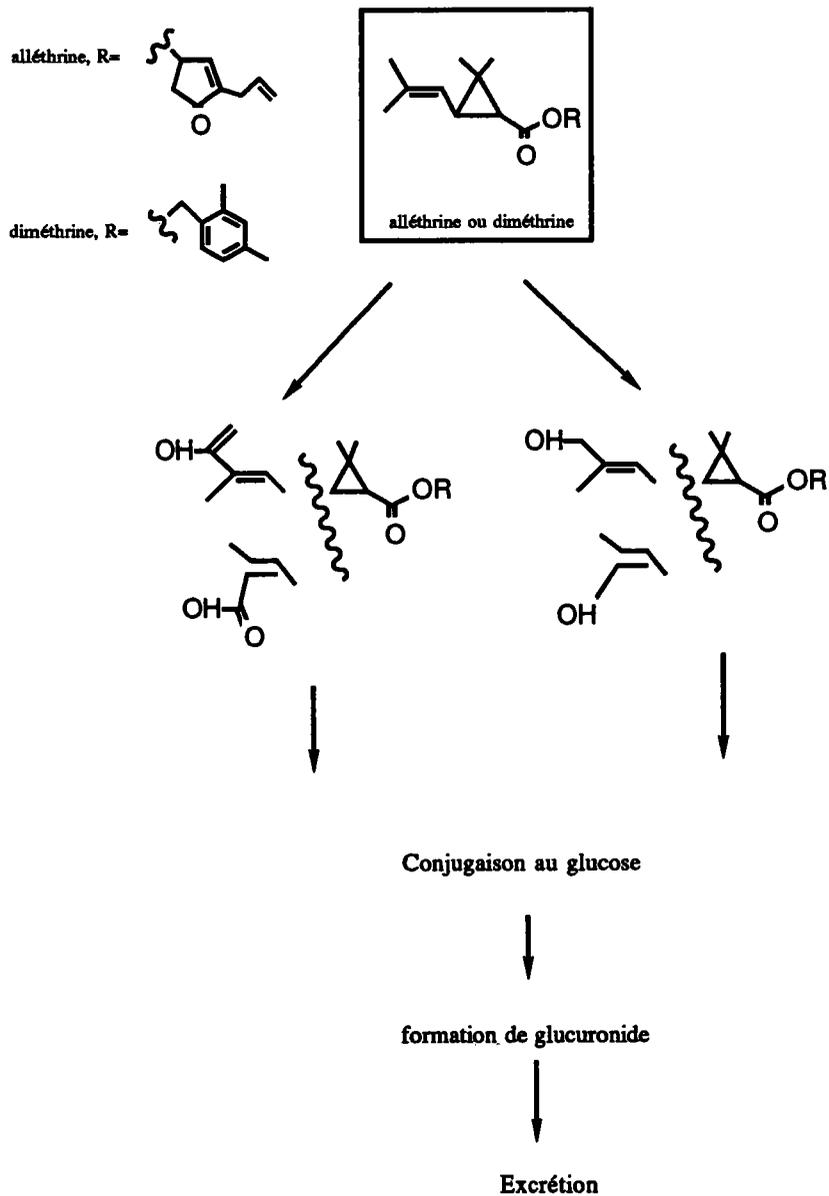
Les pyréthriinoïdes, durant la pénétration cuticulaire, le transport par l'hémolymphe et le stockage, subissent l'action des enzymes de biotransformation et de détoxification. Ces processus biochimiques, aboutissent à une modification de la configuration moléculaire et à une perte de l'activité biologique. L'élimination correspond à un stockage ou à une excrétion par voie digestive du toxique ou de ses métabolites (SHONO *et al.*, 1979). Les pyréthriinoïdes sont biodégradés suivant les grandes voies métaboliques de l'isomérisation, de l'hydrolyse et de l'oxydation. Ils donnent alors trois groupes majeurs de métabolites, que l'on retrouve sous forme libre.

1-Les métabolites avec une liaison ester intacte

2-Les métabolites comprenant la fonction acide issue du clivage

3-Les métabolites comprenant la fonction alcool issue du clivage

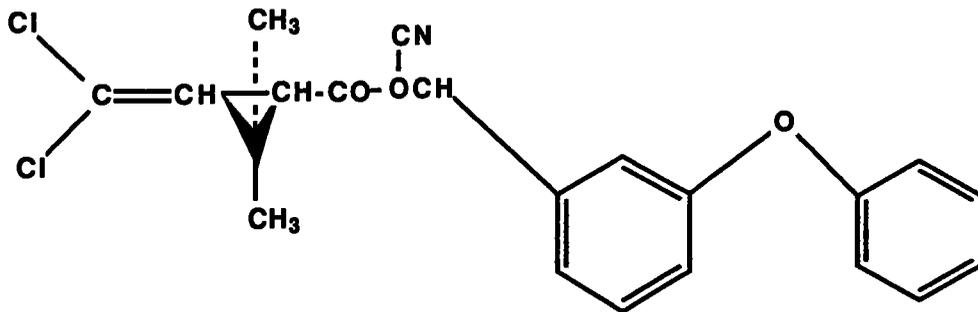
Après clivage les métabolites provenant des fractions acides et alcools, convertis en composés plus simples, hydrosolubles, sont excrétés sous forme de glucuronides (SHONO *et al.*, 1979) (Fig.2). Les mécanismes utilisés par les arthropodes pour assurer le métabolisme des pyréthrinoïdes sont présents dans tous les tissus (cuticule, intestin et corps gras.). Les voies métaboliques de dégradation sont maintenant bien connues pour la majorité des pyréthrinoïdes (SHONO *et al.*, 1979).



## 1. 5-LA CYPERMETHRINE

**1. 5. 1-Nomenclature et formule chimique** (Fig. 3):  $C_{22}H_{19}NO_3Cl_2$

(±)-cyano-3-phenoxybenzyl(±)(cis-trans-3,2-dichlorovinyle,2-dichlorovinyl)2-2diméthyl cyclopropacarboxylate.



**Figure 3:** Structure chimique développée de la cyperméthrine

### 1. 5. 2-Propriétés physico-chimiques:

-PM: 416,3

-Produit visqueux jaune-brun

-Semi-solide, liquide à 60°C

-Pression vapeur 190 nPa

-Solubilité dans l'eau 0,01-0,2 mg/litre

-Solubilité dans l'acétone (450 mg/l)

-Stable à pH 4

-Biodégradable

-Agit par contact et ingestion, possède un effet répulsif et provoque l'inhibition de la ponte chez les adultes.

## 2-LES ORGANOPHOSPHORES (OPs)

Les organophosphorés (Fig. 4) sont des esters d'acide phosphorique ou phosphorothionates, leurs structures et nomenclatures ont été bien déterminés par SPENCER (1972). Ils possèdent un large spectre d'action, le premier introduit en 1944 est le TEPP (tétraéthylpyrophosphate) très vite délaissé à cause de sa haute toxicité envers les mammifères.

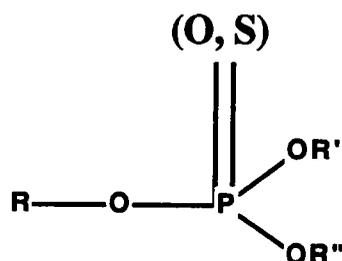
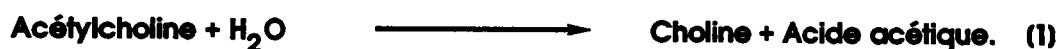


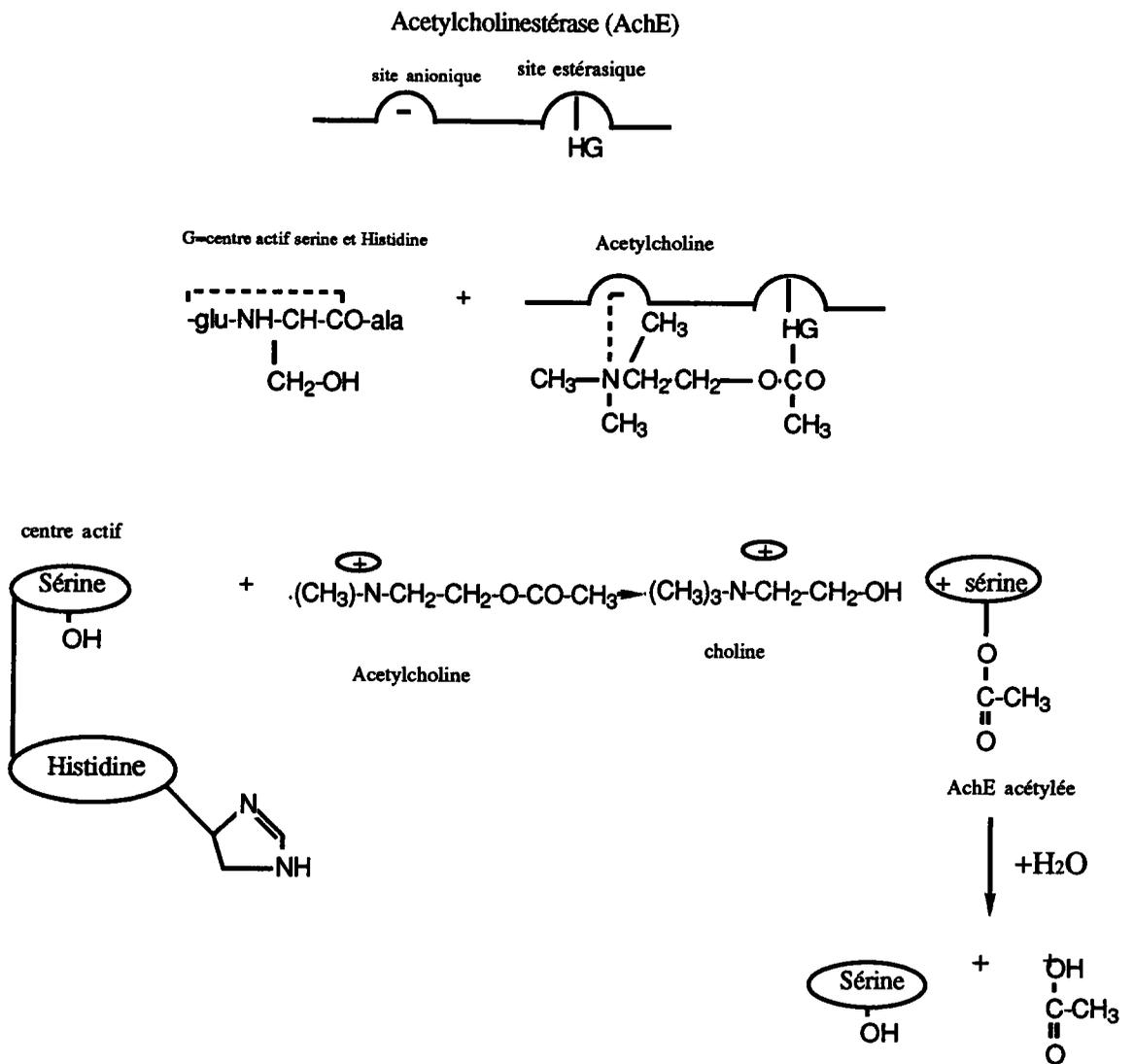
Figure 4: Structure chimique générale des organophosphorés

### 2.1-Mode d'action des organophosphorés

Les organophosphorés agissent principalement sur l'acétylcholinestérase souvent utilisée comme indicateur d'intoxication par ces insecticides (KASTURI & CHANDRASHEKAR, 1977) qui effectuent l'hydrolyse de l'acétylcholine, médiateur chimique essentiel dans la transmission de l'influx nerveux (MASSOULIE & TOUTANT, 1988).

Les cholinestérases catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine suivant la réaction (1).





**Figure 5:** Acétylation et hydrolyse de l'AChE (Murphy, 1980)

Pour que cette réaction puisse se faire, l'acétylcholine doit se fixer sur l'enzyme au niveau de 2 sites distincts: un site anionique et un site cationique.

L'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés est due à leur analogie structurale avec l'acétylcholine. Ces insecticides sont capables de se fixer de manière très forte, quasi irréversible, sur le site estérasique des cholinestérases. Rapidement une accumulation d'acétylcholine va déclencher les symptômes caractéristiques de l'intoxication par les organophosphorés: tremblement, incoordination des mouvements, paralysie.

## **2. 2-Mécanisme d'action biochimique de l'inhibition des cholinestérases**

Pour bien comprendre le mécanisme d'action des organophosphorés, il est intéressant d'observer les étapes de l'hydrolyse enzymatique de l'acétylcholine (MURPHY, 1980) (Fig. 5).

## **2. 3-Inhibition de la cholinestérase par les organophosphorés**

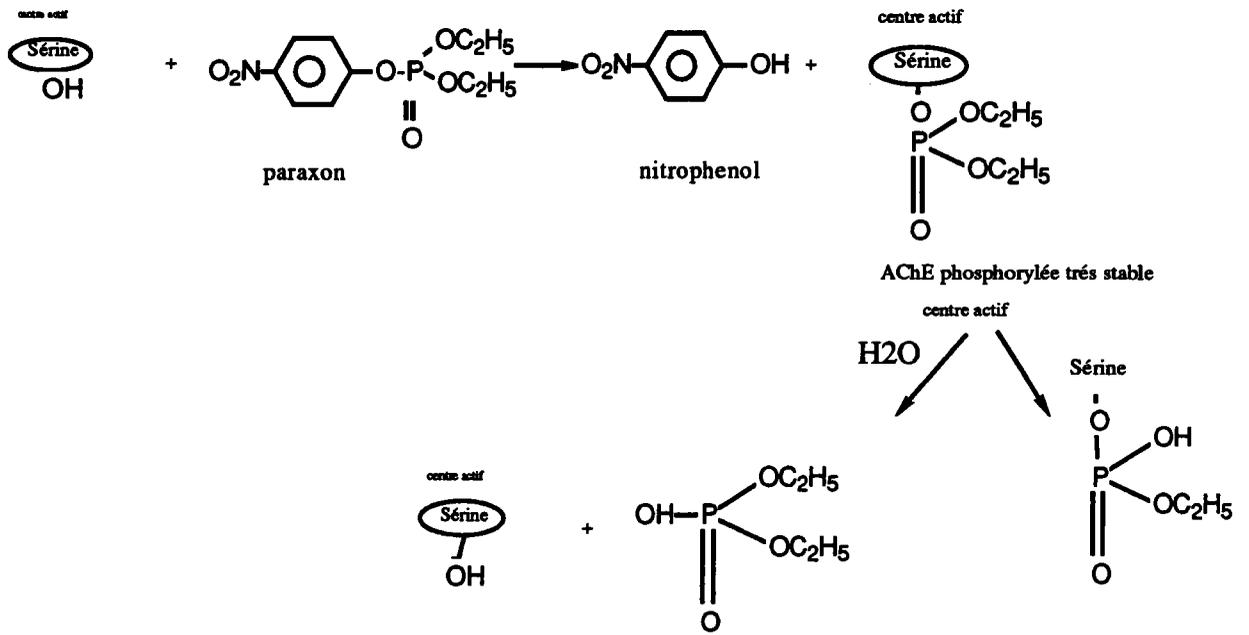
Les organophosphorés présentent une forte affinité pour les sites estérasiques à cause d'une analogie structurale avec l'acétylcholine (Fig.6).

La liaison O-P covalente est beaucoup plus forte que la liaison C-O de la cholinestérase acétylée par le caractère électrophile du phosphate. La régénération de l'enzyme phosphorylée en présence d'eau est donc très difficile, d'où inhibition quasi irréversible entraînant une accumulation de l'acétylcholine.

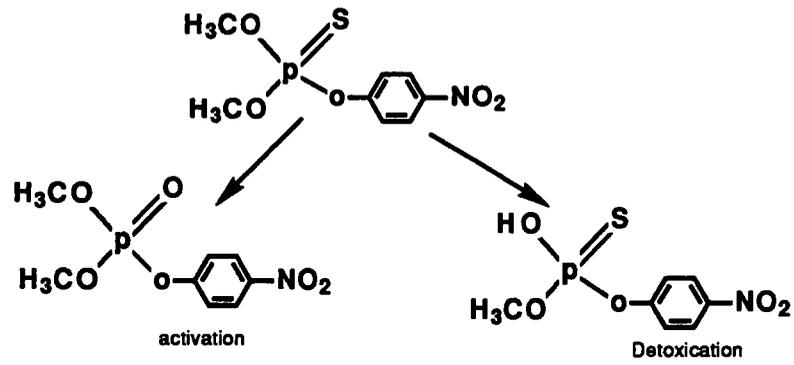
## **2. 4-Métabolisme et résistance aux organophosphorés**

### **2. 4.1-Oxydation**

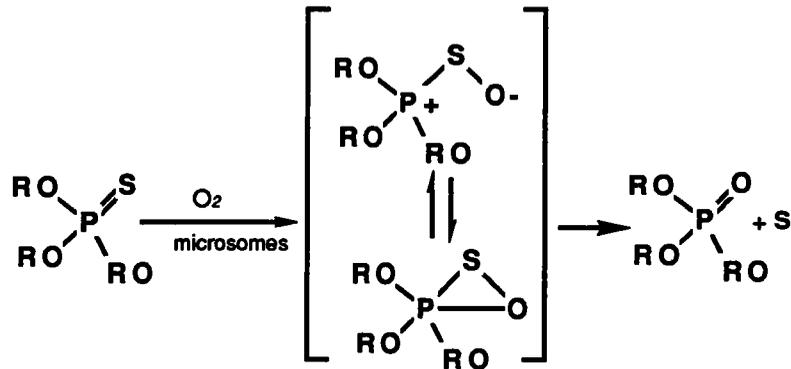
Les organophosphorés sont attaqués par au moins 3 systèmes enzymatiques ; carboxylestérase, phosphatases et la glutathion-S-transférase. Le cytochrome P450 peut agir sur l'un des carbones du groupement alkyle des organophosphorés, ou par



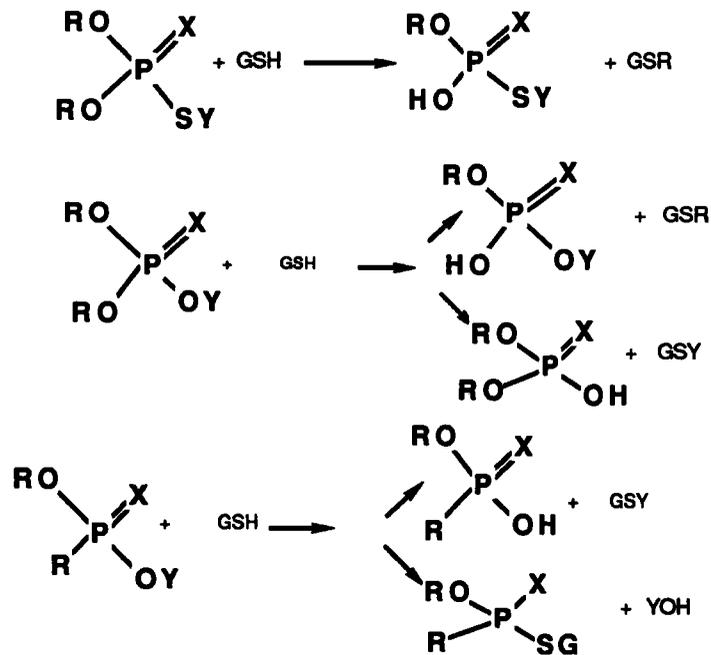
**Figure 6:** Inhibition de l'acétylcholinestérase (MURPHY, 1980)



détoxication et activation du thiophosphate par le cytochrome P-450



Mécanisme hypothétique de la transformation de P=S à P=O



**Figure 7:** Voies hypothétiques du métabolisme des organophosphorés par la glutathion transférase ((BRATTSTEN, 1990).

### 2. 4. 2-L'hydrolyse

Les carboxylestérases participent aux mécanismes de la résistance aux organophosphorés. Par exemple, Les malathionases sont très spécifiques du malathion et partagent la molécule en mono ou diacide (OPPENOORTH, 1984).

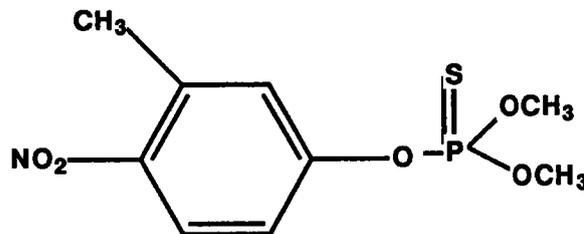
### 2. 4. 3-Conjugaison (BRATSTTEN, 1990)

La glutathion-S-transférase (GSH) intervient dans la substitution nucléophile (Fig.7).

## 2. 5-LE FENITROTHION

### 2. 5. 1-Nomenclature et formule chimique $C_9H_{12}O_5NPS$

Triphosphate de o-o diméthyl et de o-(méthyl-3 nitrophényl) (Fig. 8)



**Figure 8:** Structure chimique développée du fénitrothion

### 2. 5. 2-Propriétés physico-chimiques et biologiques:

- P. M: 277,2
- Liquide jaune brun
- Point d'ébullition 140-150°C
- Pression vapeur 18 nPa à 20°C
- Solubilité 14 mg/l d'eau à 30°C

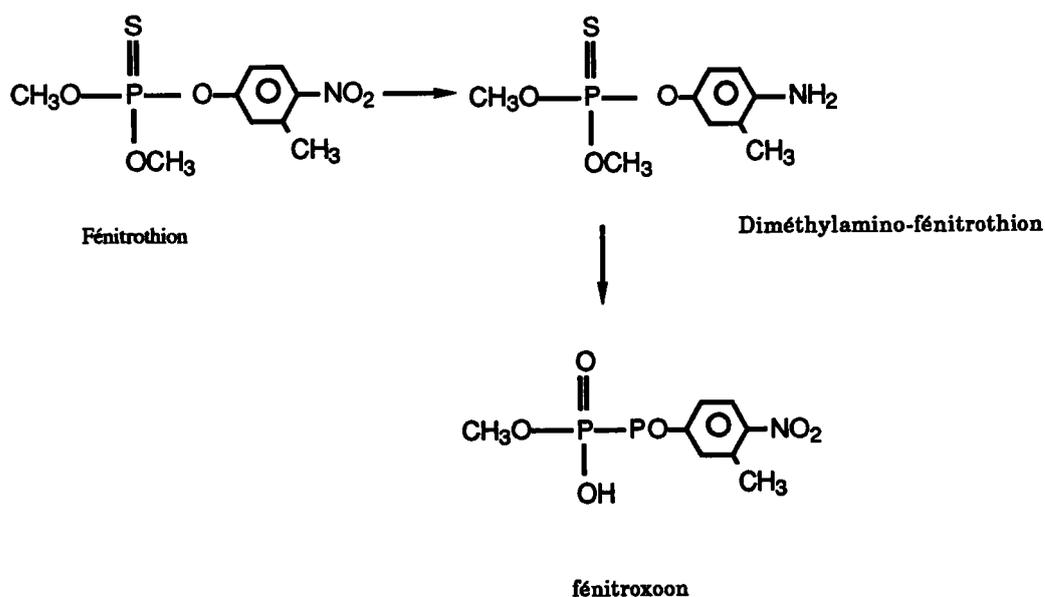
-Instable en milieu alcalin

-Agit par contact et ingestion

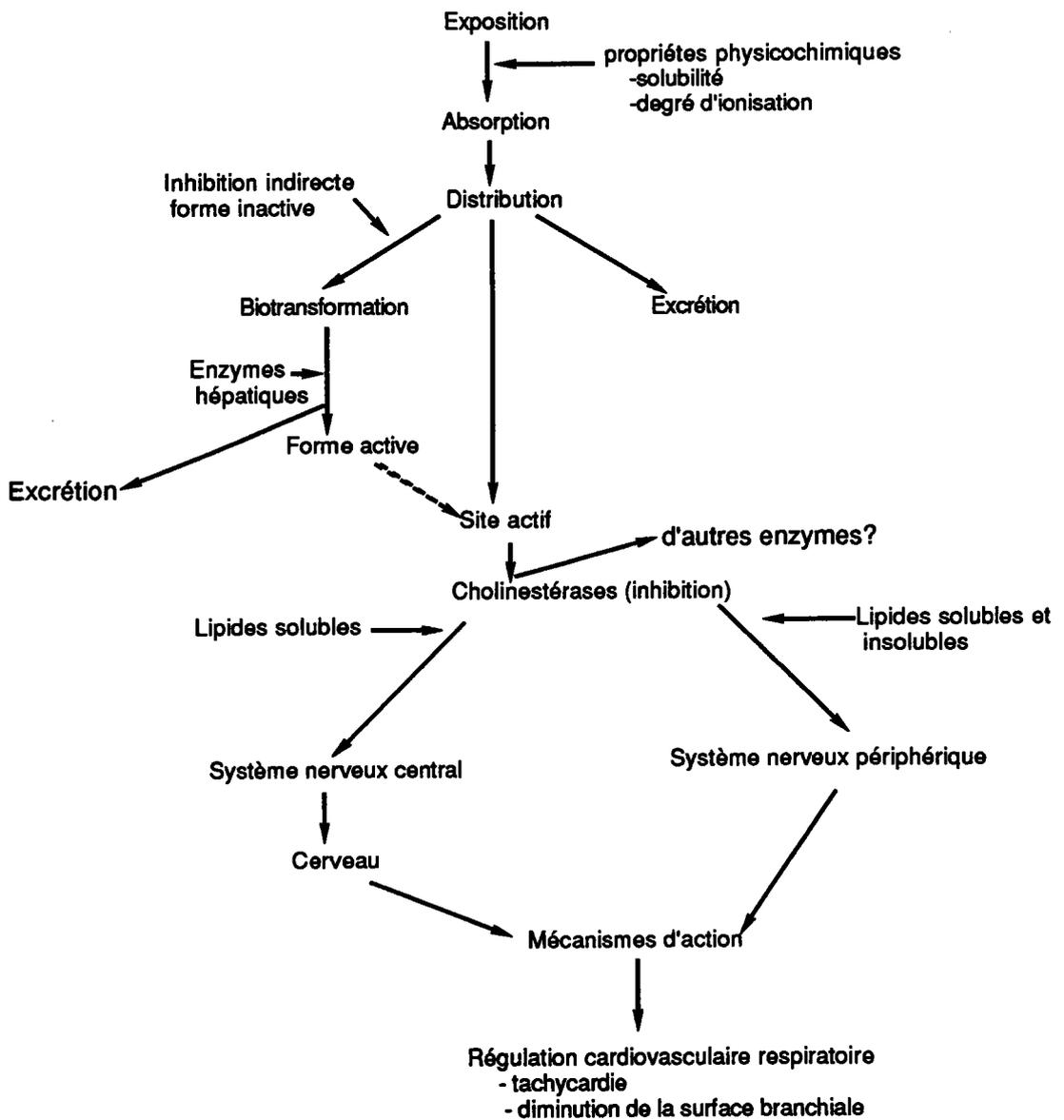
-Inhibe l'acétylcholinestérase, la succinate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, la pyruvate déshydrogénase, la lactate déshydrogénase (BHAGYALAKSHMI & SREENIVASVAL,1984).

### 2. 5. 3-Dégradation du Fénitrothion

Le fénitrothion est hydrolysé à pH>7 dans l'eau, mais il est plus persistant en milieu acide. Sa demie vie dans l'eau à 25°C varie de 60 heures à pH 5,42, à 22 heures à pH 8,2. (SUNDARAM, 1973). Le fénitrothion est aussi biodégradable (Fig. 9), *Bacillus subtilis* le décompose en amino-fénitrothion et en fénitroxoon (MOODY, 1978).



**Figure 9:** Biodégradation du fénitrothion par *Bacillus subtilis*



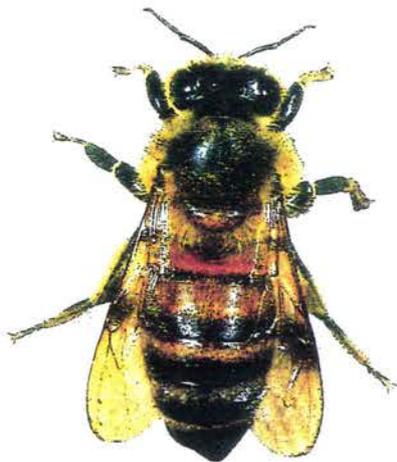
**Figure 10:** Influence de différents facteurs sur la toxicité du fénitrothion chez le poisson *Tilapia castaneum* (SYMONS, 1976).

Sa biodégradation en milieu aquatique conduit à un grand nombre de métabolites autant ou plus toxiques que le produit initial (ANJUN & SYED, 1986) (Tab. 2). SYMONS (1976) de son côté a essayé d'établir une liste des principaux facteurs externes et internes qui pourraient agir sur la toxicité du fénitrothion dans les conditions normales (Fig. 10).

**Tableau 2:** Toxicité relative des métabolites du fénitrothion exprimée par rapport à la molécule d'origine chez le poisson *Tilapia casteneum* adulte (ANJUN & SYED, 1986)

Organe	Métabolites	Toxicité relative: DL50 (métabolite/DL50 fénitrothion)
Foie	indéterminé	200
	fénitrooxon	133.333
	indéterminé	71.428
	N-acétyl-aminofénitrothion	40
Cerveau	méthyl-4-nitrophenol	1
	indéterminé	1
	diméthyl-n-acétyl-amino-fénitrooxon	1,66
Rein	diméthyl-n-acétyl-amino-fénitrooxon	1
	indéterminé	1,66
	indéterminé	1
	indéterminé	1

a



b



c



**Photo 1:** Les trois castes chez *Apis mellifera* (a) ouvrière, (b) mâle, (c) reine

## C-L'ABEILLE MELLIFERE (photo. 1)

### 1-SYSTEMATIQUE

Embranchement:	ARTHROPODES
Sous embranchement:	ANTENNATES
Classe:	INSECTES
Sous classe:	PTERYGOTES
Section:	NEOPTERES
Ordre:	HYMENOPTERES
Groupe:	ACULEATES
Famille:	APIDES
Genre:	<b><i>Apis</i></b>
Espèce:	<b><i>mellifera</i></b>

### 2-BIOLOGIE

#### 2.1-Anatomie interne

##### 2.1.1-Appareil digestif

Il est formé de trois parties à fonctions différentes (CHAUVIN, 1968).

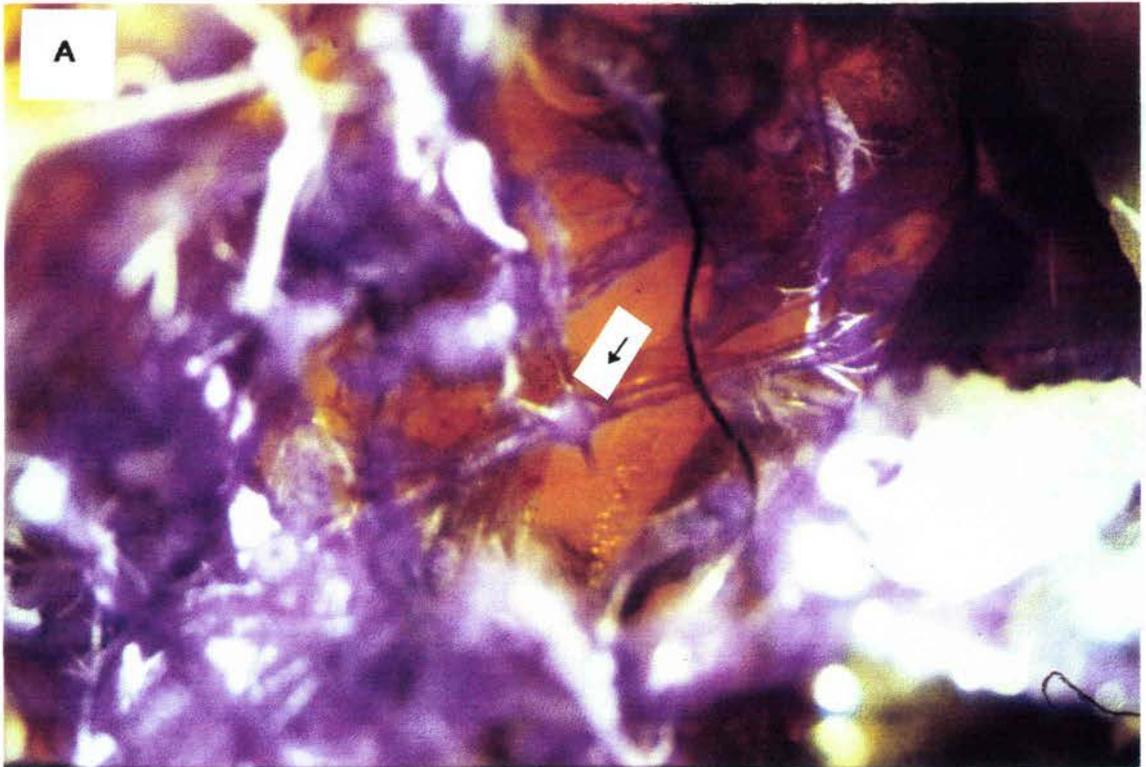
⇒ L'intestin antérieur: possède comme fonction principale le transport et le stockage du nectar.

⇒ L'intestin moyen: appelé estomac ou ventricule participe à la digestion des aliments et l'assimilation des nutriments.

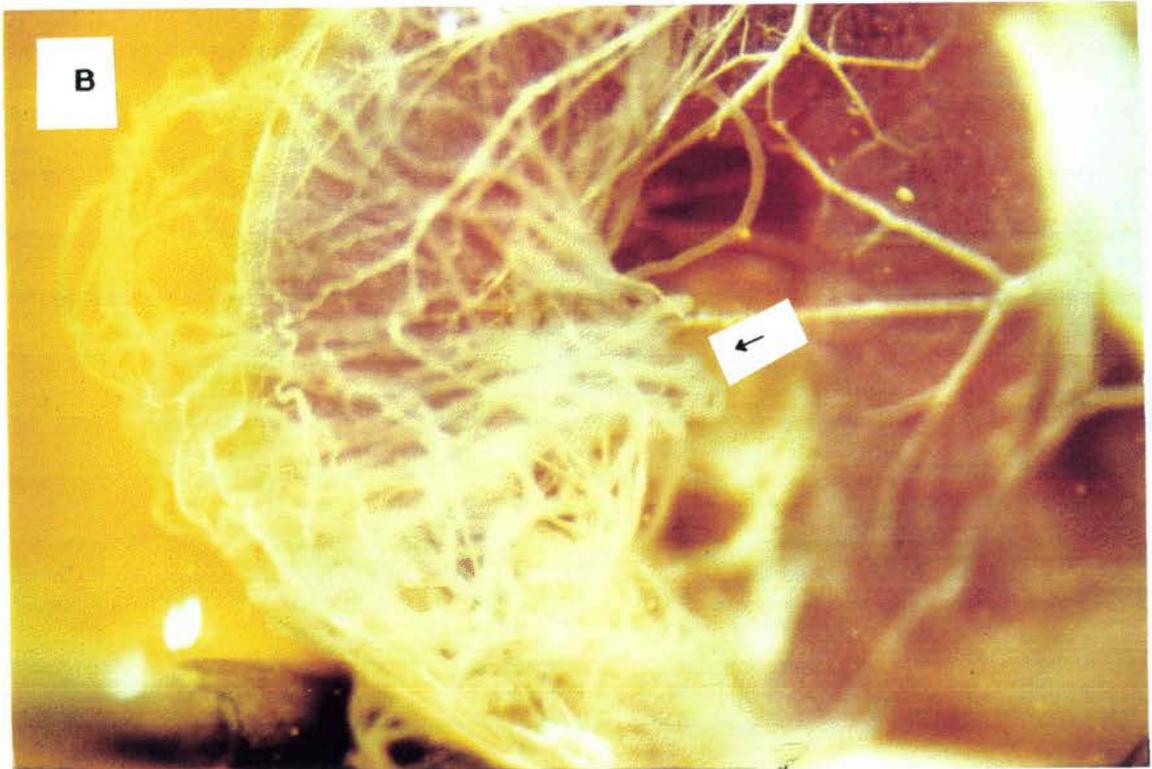
⇒ L'intestin postérieur: partie réservée à l'excrétion comprend principalement les tubes de Malpighi, lieu d'excrétion et de détoxification (photo 2).

##### 2.1. 2-Appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est trachéal: l'air est acheminé directement aux trachées situées dans le thorax et l'abdomen, apportent l'oxygène nécessaire aux tissus (CHAUVIN, 1968).



**Photo 2:** Chaîne ventrale des ganglions nerveux chez *Apis mellifera* (grossissement 16 x)



**Photo 3:** Les tubes de Malpighi chez *Apis mellifera* (grossissement 16 x)

### 2.1.3-Système glandulaire

**Tableau 3:** Système glandulaire chez *Apis mellifera*

Glandes	Abeilles	Fonctions
Cirières	13 à 18 jours	Production de cire
Salivaires	3 castes	nourricières sécrétion gelée royale production d'enzymes
Mandibulaires	3 castes	sécrétion de lipides et protides
Labiales	3 castes	Hormone juvénile
Nasanoff	ouvrières	Phéromone d'alerte

### 2. 1. 4-Appareil circulatoire:

Comme chez tous les insectes, il est composé d'un vaisseau dorsal contractile, et d'un cœur à cinq ventricules (CHAUVIN 1968). L'hémolymphe ne contient aucun pigment respiratoire. Elle ne transporte pas d'oxygène mais véhicule seulement les nutriments.

### 2. 1. 5-Système nerveux

Il est composé de:

⇒ Ganglions cérébroïdes au dessus de l'œsophage formant le cerveau.

⇒ Ganglions œsophagiens autour de l'œsophage.

⇒ Une chaîne ganglionnaire ventrale qui part de la tête jusqu'à la partie postérieure du corps (photo 2).

### **2.1. 6-Glandes endocrines:**

Elle se trouvent au dessus du tube digestif et comprennent:

⇒ Les corpora allata, les corpora cardiaca. Elles fabriquent l'hormone juvénile, qui intervient dans la régulation des mues et la métamorphose (CHAUVIN, 1960). Elles sont aussi le lieu de stockage et d'élaboration de neuropeptides, tels les hormones hyperglycémiantes et AKH.

### **2.1. 7-Appareil reproducteur**

Chez l'ouvrière, les deux ovaires s'étendent depuis le jabot jusqu'au 6<sup>ème</sup> ganglion abdominal. La spermathèque (réservoir des spermatozoïdes) est sous forme d'une minuscule vésicule. L'appareil génital des ouvrières est atrophié, mais lorsque la colonie est orpheline, certaines abeilles peuvent se mettre à pondre, leurs ovaires deviennent fonctionnels et les œufs, par un phénomène de parthénogenèse donnent uniquement des mâles. Chez le mâle les testicules sont situés dans la zone antero-dorsale de l'abdomen.

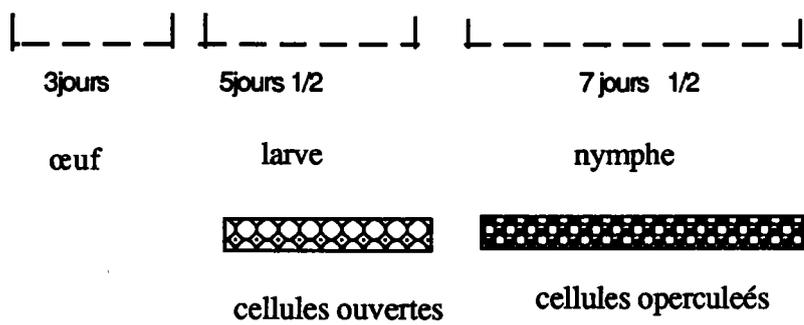
## **3-ORGANISATION SOCIALE DES ABEILLES**

Les abeilles sont organisées selon une structure sociale bien établie, on distingue deux castes. La caste femelle: les individus sont issus d'œufs fécondés (reine et ouvrières).

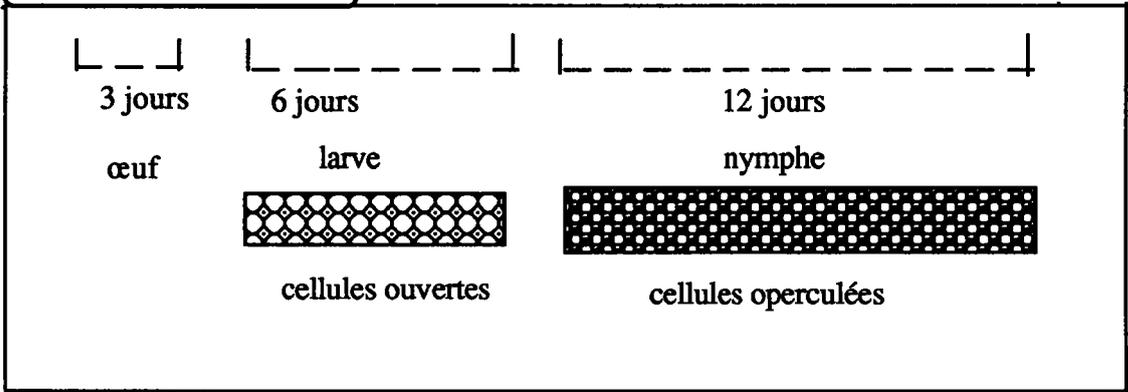
La caste mâle: les individus sont issus d'œufs non fécondés (mâle parthénogénétique).

Le fait de pondre des œufs fécondés ou non, dépend des pattes postérieures de la reine et de la taille de l'alvéole qui induisent par réflexe l'ouverture ou non de la spermathèque (VONFRISH, 1955 ; CHAUVIN, 1956). La possibilité d'obtenir une reine ou une ouvrière est en relation avec le régime alimentaire de la larve. L'hormone juvénile présente dans la gelée royale est l'un des facteurs de la différenciation de la larve en reine. L'ouvrière effectue toutes les fonctions: récolte du pollen et du nectar, de la propolis, fabrication de la cire, du miel, de la gelée royale, construction des rayons,

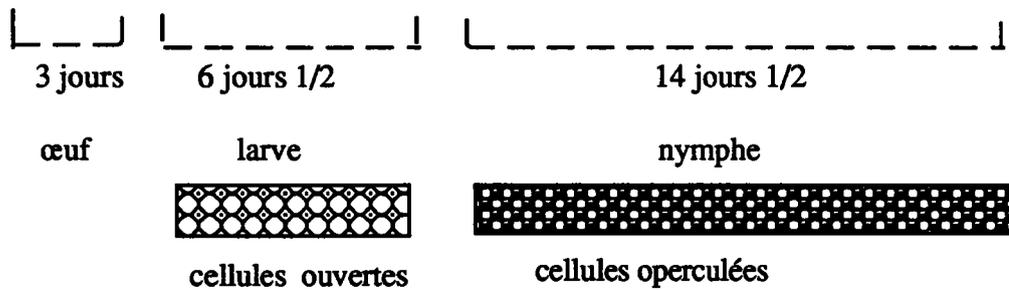
**REINE : 16 JOURS**



**OUVRIERE : 21 JOURS**



**MALE: 24 JOURS**



**Figure 11:** Cycle évolutif des trois castes chez *Apis mellifera*, dans les conditions standards de température (35°C) et d'humidité (75%).

élevage du couvain, et ceci en fonction de son âge qui correspond à un développement différent de certaines glandes (mandibulaires et hypopharyngiennes). De l'éclosion jusqu'à la mort, l'abeille passe par deux stades:

⇒ Du 1<sup>er</sup> jour au 10<sup>ème</sup> jour: les ouvrières sont au service de la ruche, nettoient les cellules et nourrissent les larves, ventilent et fabriquent de la cire. A la fin de cette période les abeilles sortent de la ruche et font des vols d'orientation pour reconnaître les environs.

⇒ Du 11<sup>ème</sup> jour au 20<sup>ème</sup> jours: l'abeille est butineuse, ramène à la ruche nectar, pollen et propolis. La durée de ces deux stades est très variable et elle est fonction de la saison et des besoins de la colonie. Le stade ouvrière d'intérieur peut durer de 8 jours à 5 semaines (CHAUVIN, 1960). Le cycle de développement varie selon la caste (Fig. 11).

#### **4-ROLE DE L'ABEILLE DANS L'ENVIRONNEMENT**

Si on se limite à la notion de production de miel on risque de faire abstraction du rôle fondamental de l'abeille en tant qu'insecte pollinisateur: il y a en effet une relation directe entre la quantité de nectar et de pollen récoltée, et l'augmentation de la productivité des écosystèmes par le biais de la pollinisation (FOSTER & LEVIN, 1967).

L'abeille intervient dans la pollinisation de toutes les espèces végétales capables de lui fournir du nectar. La pollinisation est une étape capitale dans la production des fruits et des graines. Pour une grande partie des espèces végétales on a pu démontrer que la pollinisation est en rapport avec le rendement en fruit et leur qualité (BARBIER, 1986 ; VAISSIERE, 1991). La présence de poils crochus sur les pattes postérieures de l'abeille est une adaptation qui permet un transport plus efficace du pollen.

La production du pollen est supérieure chez les plantes dont la pollinisation est assurée par les abeilles (FOSTER & LEVIN, 1967). BORNECK (1987) ; BORNECK & MERLE (1989)

montrent le rôle que joue l'abeille dans l'économie de l'agriculture européenne par le biais de la pollinisation.

#### **D-EFFET DES PESTICIDES SUR LES ABEILLES**

Développé dans le but d'accroître la production agricole, l'emploi devenu abusif des produits phytosanitaires comme seul moyen actuel de lutte contre les ravageurs, a provoqué un appauvrissement considérable des populations d'abeilles.(ELLIOTT & JANES, 1984 ; FAUCON *et al.*, 1986a). L'abeille dont le rôle bénéfique n'est plus à démontrer, est exposée à ces produits de traitements en allant recueillir nectar et pollen nécessaires à son alimentation (NAZAROV, 1969). ANDERSON & WOJTAS (1986) relèvent, suite à une enquête qui s'est déroulée durant les années 83/84, que plus de 70% des ruchers, ont été contaminés par des biphényles polychlorés. FLECHE *et al* (1985), à la suite d'une enquête écopathologique concluent que 71% des abeilles prélevées sont contaminées par les insecticides, 92% des échantillons de pollen présentaient également des contaminations. En 1988, 250 colonies d'abeilles ont été anéanties à la suite de traitements du colza (LAMARTYN., 1988).

Des perturbations comportementales, une augmentation d'agressivité et une communication perturbée, ont été observées chez des abeilles mises en contact avec des pyréthrinoïdes (COX & WILSON., 1984). HERVE (1982) a constaté une importante perte d'eau après intoxication à la deltaméthrine. D'autres études du métabolisme faites sur l'abeille, notamment sur la capacité de détoxification des abeilles ont permis de savoir que les pyréthrinoïdes provoquent une induction du cytochrome P450 (YU *et al.*, 1984). BOUNIAS *et al* (1985a) notent que chez l'abeille mellifère, une intoxication par une dose sub létale de pyréthrinoïde, entraîne des troubles biochimiques (glucidiques et lipidiques), d'autre part BOUNIAS & MORGAN (1987) ont pu montrer la corrélation qui existe entre la productivité des ruches et le taux de glucose dans l'hémolymphe d'abeilles naissantes. CLARK & MATSMURA (1982) observent chez l'abeille une

diminution de l'activité ATPasique en précisant que le site d'action serait situé au niveau des canaux à sodium. POLLET (1987) conclut qu'à 20°C les pyréthrinoïdes diminuent la consommation d'oxygène, par contre à 35°C aucune différence significative par rapport aux témoins n'a été signalée. En plus de l'effet répulsif et toxique des pyréthrinoïdes, DAVIS & SHUEL (1985) et DAVIS *et al* (1988) ont pu déterminer l'effet inhibiteur des pyréthrinoïdes sur la croissance et le développement des larves au sein d'un rucher soumis à des concentrations sublétales. Les études toxicologiques des insecticides organophosphorés, portent surtout sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (METKALF & MARCH, 1990). MELKSCHAM *et al* (1988) classent le fénitrothion parmi les composés qui entraînent des modifications significatives dans l'orientation et l'agressivité des abeilles. Selon ASHELISHA & SIVAKUMAR (1987), l'activité ATPasique ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) se trouverait également modifiée sous l'action du parathion-éthyl. En parallèle CHANDRASHEKAR (1979) constate que certaines enzymes digestives comme les protéases et les amylases, sont directement touchées par les insecticides, entraînant une nette diminution de l'activité des abeilles. Le phénomène de la contamination par le flux de chaîne alimentaire, est très marqué au niveau des ruches (MORITZ & HALLMEN, 1986). COURTOIS & LECOMTE (1958, 1961), remarquent qu'au bout de 36 heures, toute la ruche s'est trouvée contaminée. ROBAUX (1986) observe une accumulation dans le miel et la cire d'insecticides destinés à traiter les abeilles contre la varroatose. Pour cette raison beaucoup de chercheurs s'orientent aujourd'hui vers l'utilisation des méthodes dites alternatives, basées sur la lutte biologique et les produits naturels comme les huiles essentielles (COLIN & GONZALES, 1986), les sels de cuivres (NECTOUX & BOUNIAS, 1988), et des hormones de synthèse (HARAGASIM & ZDAREK, 1972). Cependant on connaît encore, mal les effets biologiques que ces nouveaux produits peuvent entraîner.

## **III-MATERIELS ET METHODES**

**A-AU LABORATOIRE**

## **1-Matériel chimique**

Les matières actives de la cyperméthrine et du fénitrothion (99%), nous ont été fournies par SIGMA CHIMIE (France), tandis que les formulations commerciales (cymbush: 100g de cyperméthrine pure/ litre d'éther de pétrole et folithion 550g de fénitrothion pur/ litre d'éther de pétrole) proviennent de chez SOPRA chimie. La première dilution des deux produits est effectuée à 1g/l dans de l'acétone. Ensuite les gammes de concentrations des expériences se font dans, le sirop de saccharose, quand il s'agit d'une intoxication par nourrissage, dans l'eau distillée pour une administration par injection ou dans l'acétone pour déterminer les DL50 par contact.

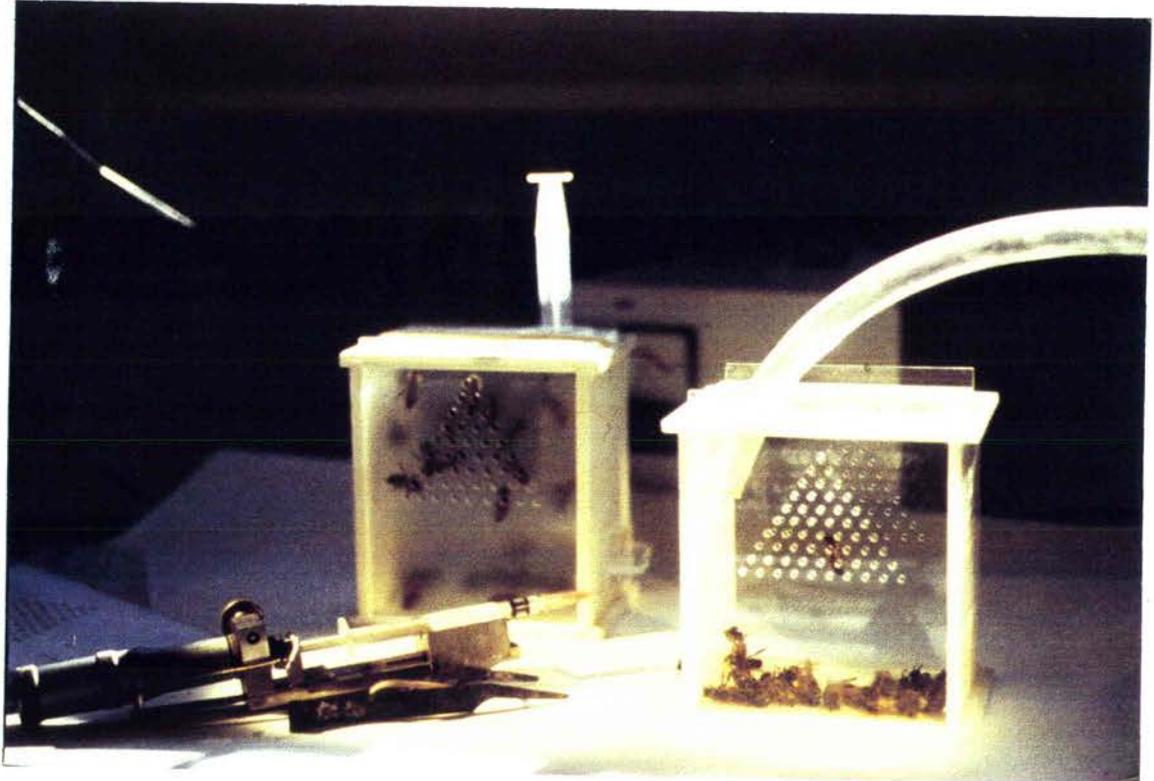
## **2-Matériel biologique**

### **2.1-Le rucher**

Le rucher compte 80 ruches réparties entre le laboratoire à Sophia-Antipolis et un site situé à 10 Km. Ces ruches de type "LANGSTROTH" sont installées dans une forêt à dominance coniférale. Pour chaque expérience, quelques cadres de couvain operculé délestés de leur abeilles adultes sont prélevés sur la même ruche pour obtenir une population homogène.

### **2. 2-L'élevage au laboratoire**

Les cadres sont ramenés au laboratoire et placés dans une étuve thermostatée (Couprie-Lyon), maintenue à  $(33 \pm 1^\circ\text{C})$  et à  $(50\% \pm 5\%$  d'humidité) pour permettre un développement optimal du couvain. Les cadres reposent environ 24 heures dans ces conditions afin de permettre l'émergence. Les abeilles sont alors retirées de la surface des cadres et réparties en cagettes dans lesquelles elles sont élevées. Ces cagettes sont en plexiglas 10 cm/10 cm/7 cm (PAIN, 1969). Deux des cotés sont transparents et garnis de trous pour permettre en même temps l'observation de l'activité des abeilles et l'aération. La face supérieure est percée d'un trou de façon à engager une seringue



**Photo 4:** Cagettes expérimentales (PAIN, 1969) utilisées pour les essais de toxicité au laboratoire

de 5 ml, faisant fonction de nourrisseur et dont la graduation permet de suivre la consommation des abeilles (photo. 4). Les cagettes sont ensuite mises à l'obscurité dans l'enceinte régulée.

### **3-Mode opératoire**

#### **3.1-Détermination de la DL50**

C'est la méthode officielle (n° 95) conseillée par la société française de phytiatrie et de phytopharmacie (International Commission for bee botany, 1980 ; Commission des Essais Biologiques, 1982) qui a été utilisée pour le calcul des DL50. Deux substance de référence, l'une à forte toxicité (lindane) et l'autre à faible toxicité (phosalone), ainsi qu'un témoin non traité. Il s'agit ensuite de déterminer la DL50, dose qui entraîne la mortalité de 50% de la population en 24 heures.

-les abeilles sont d'abords anesthésiées au CO<sub>2</sub> pendant une minute

-elles sont réparties en lots de 30 abeilles par cagette (photo 4)

-la distribution des produits se fera comme suit:

⇒ 5 concentrations géométriquement croissantes

⇒ 5 cagettes par concentration

⇒ 5 cagettes pour le lot témoin

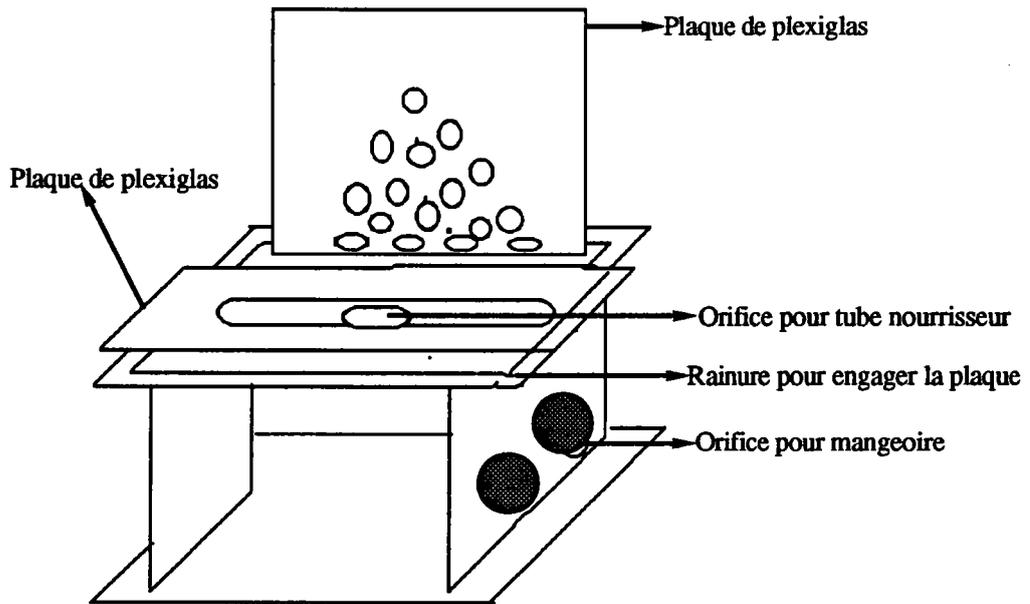
-le mode d'intoxication adopté pour ces essais est le contact topique. 1 µl ± 0,05 µl de solution acétonique contenant l'insecticide est déposée sur le thorax de l'abeille.

-le nourrissage est à base de sirop de saccharose à raison de 0,5 Kg/litre d'eau distillée.

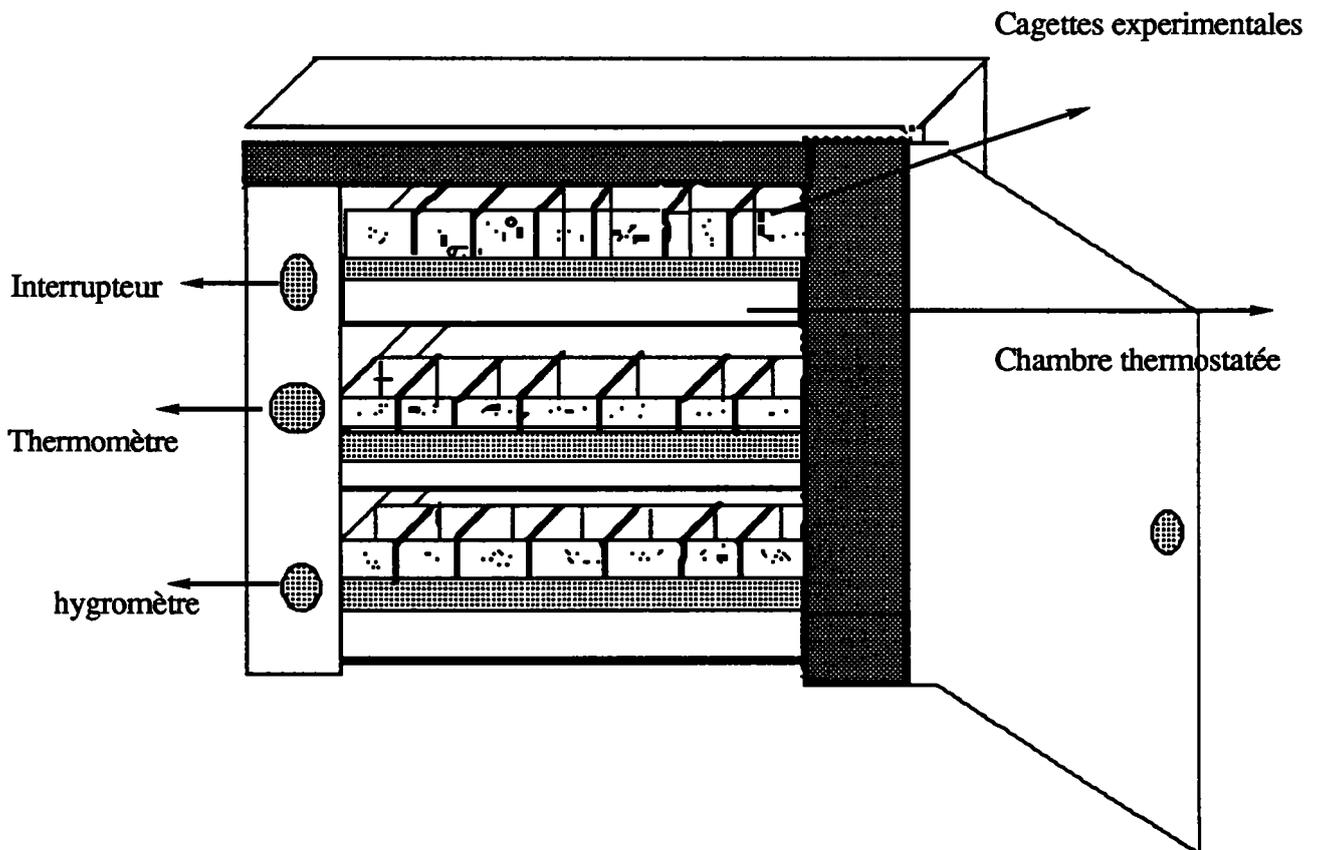
-les cagettes sont mises dans l'étuve à l'obscurité et la lecture est réalisée après 24, 48, ou 72 heures (Fig. 12 ; Fig. 13).

#### **3. 1. 1-Toxicité en fonction de l'âge des abeilles et de la nature des produits utilisés**

Le protocole est le même que précédemment sauf que les abeilles tout venant sont prises directement dans la ruche et d'une manière aléatoire.



**Figure 12:** Cagette de type (PAIN, 1969), utilisée pour recevoir les abeilles et à les maintenir en captivité à l'intérieur de l'étuve.



**Figure 13:** Enceinte thermostatée " Couprie-Lyon"

### **3. 1. 2-Effet conjoint de la Cyperméthrine et du Virus de la paralysie Chronique (VPC)**

#### **⇒ Objectif de l'expérience**

l'objectif principal de cette manipulation est de voir si la vulnérabilité des abeilles est amplifiée par l'association d'une intoxication avec les effets d'une pathologie connue. Parmi les maladies atteignant les abeilles, la maladie noire, une virose entraînant une paralysie chronique a été particulièrement étudiée au sein du laboratoire. Le virus a été localisé et isolé pour la première fois en France (GIAUFFRET & DUTHOIT, 1966a,1966b), suivi par d'autres travaux complémentaires sur la même maladie (GIAUFFRET & CAUCAT, 1967 ; GIAUFFRET & DUTHOIT, 1969, 1970, GIAUFFRET & LAMBERT, 1972). On a ainsi pu établir d'une façon précise tous les signes cliniques caractéristiques.

La maladie apparaît essentiellement au printemps, et peut se poursuivre pendant toute l'année. Parmi les signes cliniques les plus remarquables, on peut citer

- une odeur particulière des abeilles
- une dépilation aboutissant à un tégument noir et luisant
- les abeilles présentent un rétrécissement de l'abdomen
- les abeilles malades sont souvent rejetées par leur congénères sur la planche de vol
- les ailes sont souvent écartées, et l'abdomen repose sur le support
- extension des pièces buccales
- en phase terminale, apparaissent, des tremblements saccadés des membres, une incoordination des mouvements, une paralysie des membres postérieurs et enfin une incapacité au vol. GIAUFFRET & LAMBERT(1972) ont pu localiser au niveau du cerveau et des ganglions nerveux, la présence du virus de la paralysie chronique par des méthodes histologiques et séro-immunologiques.

#### **⇒ Isolement du virus de la paralysie chronique**

Le protocole d'isolement est celui couramment utilisé au sein du laboratoire (GIAUFFRET & DUTHOIT, 1966b). 30 têtes d'abeilles suspectées d'être atteintes de maladie noire, sont

broyées dans 3 ml d'eau déminéralisée à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra turax de Beyneix). Afin de travailler toujours à froid (+4°C) toutes les manipulations se font dans un bac à glace réfrigéré. La première centrifugation est effectuée à 800g pendant 15 minutes à +4°C. Après homogénéisation et filtration, l'échantillon est centrifugé à 3600g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et conservé à -30°C.

### ⇒ **Vérification du pouvoir pathogène**

Après anesthésie au gaz carbonique, les abeilles ont reçu 1 µl de la suspension virale diluée à  $10^{-6}$  à partir du culot viral initial (en vérifiant au préalable qu'elle ne contient aucun autre germe, par des cultures successives sur milieu bactérien). Les lots ont été répartis par groupes de 30 abeilles et mis à l'étuve. Les premiers symptômes sont apparus chez les abeilles entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jours qui suit l'infection. L'intoxication à la cyperméthrine intervient en même temps. La DL50 est calculée sur 24h.

### **3. 2-Toxicité chronique par nourrissage**

La nourriture de base proposée dans tous ces essais est le sirop de saccharose (0.5 Kg/litre d'eau distillée) qui est le mieux adapté aux abeilles en captivité (BACHMAN & GORDON, 1977). Aucun apport protéique ni pollinique n'a été effectué. La toxicité d'une substance administrée aux abeilles est basée sur le critère de létalité, et le comptage des abeilles est fait quotidiennement jusqu'à la mort de tous les individus en notant la quantité du sirop ingéré. Chaque insecticide est testé selon des doses croissantes géométriquement, comparativement à un lot témoin ayant reçu le sirop de saccharose seul.

### **4-Méthodes d'évaluation de la toxicité sur *Apis mellifera***

Afin d'évaluer la toxicité d'une substance qui risque d'être en contact avec les abeilles, elle subit des tests de toxicité par contact topique et par ingestion, mais également par

contact tarsique. Le but de la plupart des tests est de déterminer la DL50 (la quantité de matière active ou produit de formulation, qui provoque la mort de 50% de la population au bout d'un intervalle de temps donné. Une échelle de toxicité a été établie par "l'international commission for Bee botany": Elle classe les produits selon leur DL50 en plusieurs catégories arbitrairement établies comme suit (ATKINS *et al.*, 1981).

DL50 > 100 µg/abeille:	"Non toxique"
10 < DL50 < 100 µg/abeille:	Peu toxique
1 < DL50 < 10 µg/abeille:	Modérément toxique
DL50 < 1 µg/abeille:	Hautement toxique

#### 4.1-Méthode de Finney (1971):

La pratique des tests "Dose-Mortalité" permet de déterminer la DL50. pour cela il faut connaître l'équation  $y=f(x)$

$y$ =Mortalité

$x$ =Concentration

Cette relation correspond en échelle logarithmique à une courbe sigmoïde asymétrique, il est donc difficile d'en déduire la DL50 avec précision. Grâce à la linéarisation permise par la double transformation de Finney (1971), le calcul est plus précis.

⇒ En abscisse la dose est exprimée par son logarithme

⇒ En ordonnée le pourcentage de mortalité est remplacé par son probit (une transformation basée sur l'utilisation de la fonction statistique de répartition, intégrale de la courbe de distribution, tenant compte de la moyenne et de l'écart-type) donnant ainsi une droite parfaitement exploitable. La théorie de la régression linéaire permet

alors d'établir l'équation  $y=ax+b$  et d'en déduire la DL50.

**y: Probits**

**x: lnC**

#### **4. 2-Méthode dérivée de l'équation de Hill (Bounias, 1989, 1990)**

Le modèle général proposé ci dessous obtenu à partir d'une courbe de mortalité sigmoïdale, conduit à la détermination algébrique de constantes caractéristiques des effets létaux sous l'effet d'un toxique. Récemment (BOUNIAS, 1989) a proposé de nouveaux concepts algébriques liés à la courbe de mortalité comme alternative à la DL50. En se basant sur la DL50 comme seul critère de toxicité, souvent on conclut par extrapolation que certains produits sont inoffensifs. La faiblesse de l'évaluation de la toxicité par le simple calcul de la DL50, réside dans le manque de discernement dans l'observation des effets toxiques. En effet on ne tient compte que de deux réponses mort ou survie et dans un laps de temps choisi arbitrairement. Par ailleurs, les insecticides peuvent avoir des effets sublétaux sur l'abeille, pour cette raison, notre approche méthodologique consiste à suivre la toxicité d'un produit tout au long de la vie de l'abeille. Les caractéristiques cinétiques de diverses courbes, notamment les courbes sigmoïdales de mortalités, obéissent à l'équation de Hill par analogie avec celles de la cinétique enzymatique. Ces courbes nous fournissent trois paramètres qui décrivent avec une grande précision les propriétés liées à la relation dose/effet durant toute la vie des abeilles.

$$M\% = M_{\max} / [ 1 + (LT_{50}/t)^{n_t} ] \quad [1]$$

M%: pourcentage de mortalité observé à l'instant t.

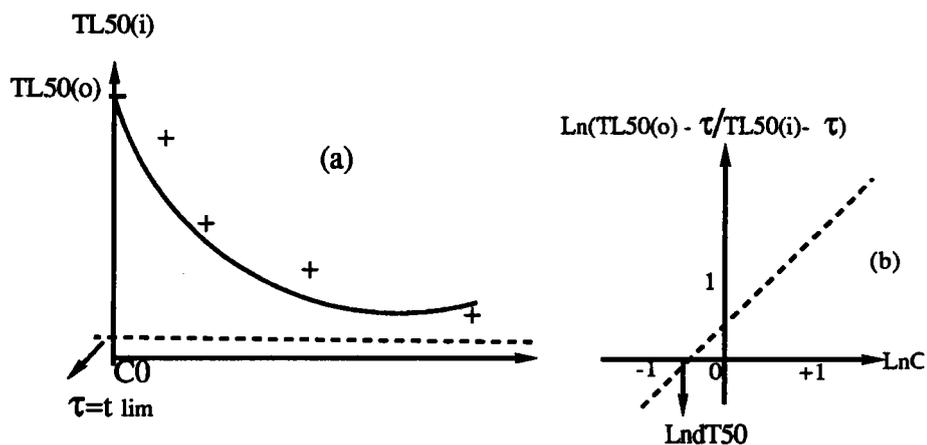
Mmax: maximum asymptotique, soit Mmax= 100% de mortalité, dans ce cas

TL50: temps au bout duquel 50% de la population est morte

nt: coefficient de Hill

**a-Le paramètre TL50:** C'est le temps au bout duquel la moitié de la population succombe à l'intoxication. L'expression des TL50 en fonction des concentrations d'un toxique, se présente généralement sous forme d'une hyperbole (Fig. 14a) dont l'équation est définie par analogie aux mécanismes généraux de l'inhibition enzymatique.

La transformation bilogarithmique (2) donne une droite (Fig.14 b) de pente  $nt$  et d'abscisse à l'origine  $dT50$ .



**Figure 14:** Variations de la TL50 en fonction des concentrations d'un toxique X  
 (a): relation directe  
 (b): forme logarithmique linéaire

$$\text{Ln} \left[ \frac{M\%}{100 - M\%} \right] = nt \cdot \text{Ln}(t) - nt \cdot \text{Ln}(TL50) \quad [2]$$

$$\left[ \frac{(TL50(o) - \tau)}{(TL50(i) - \tau)} \right] - 1 = (di/dT50)^{nt} \quad [3]$$

NB: une variante par approximation consiste à admettre que  $TL50 \rightarrow 0$ , quand la dose  $\rightarrow \infty$ .

La relation (3) se réduit alors à la forme simplifiée [3 bis]:

$$\left[ \frac{TL50(o)}{TL50(i) - 1} \right] = (di/dT50)^{nt} \quad [3 \text{ bis}]$$

dans laquelle la signification de  $dT50$  est légèrement modifiée, elle devient la concentration qui réduit de moitié la valeur initiale  $TL50(0)$  et non l'amplitude de la variation de  $TL50$  entre  $TL50(o)$  et  $\tau$ .

$TL50(o)$ : est la valeur du  $TL50$  mesuré chez le lot témoin

$TL50(i)$ : est la valeur mesurée chez le lot traité

$dT50$ : c'est la concentration qui réduit de moitié le temps ( $TL50(0) - \tau$ )

$n_t$ : coefficient de Hill du facteur temps

$\tau$ : limite asymptotique atteinte par  $TL50(i)$  quand la dose de pesticide tend vers l'infini

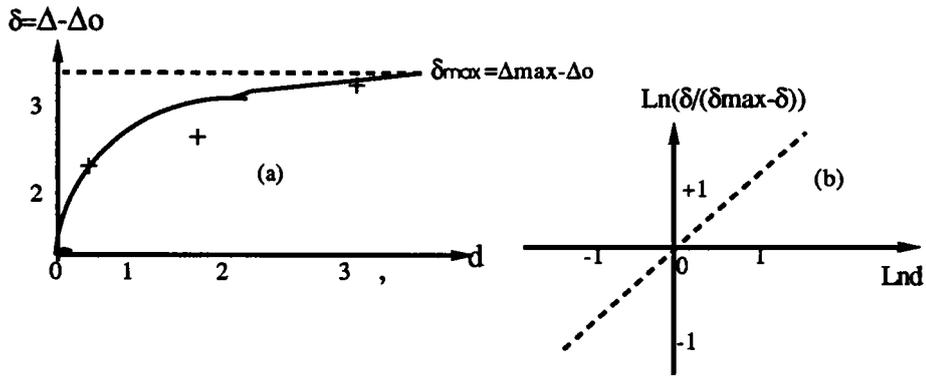
### **b-Le coefficient de HILL: ( $n_t$ )**

Par analogie avec la fonction de répartition de Finney, le coefficient de Hill se comporte comme un indice fonction de l'écart-type de la distribution. Le coefficient de Hill de la représentation, reflète la sigmoïdité de la courbe, son augmentation tend à rendre la courbe plus verticale. Une diminution du coefficient nous renseigne sur une stimulation de la durée de survie.

### **c-La vitesse de mortalité: $\Delta$**

$$\Delta = M_{\max} \cdot TL50^{-1} \cdot n_t^{-1} \cdot [(n_t - 1)^{n_t - 1} \cdot (n_t + 1)^{n_t + 1}]^{1/n_t} \quad [3]$$

Ce paramètre facultatif (car  $TL50$  et  $n_t$  suffisent à décrire complètement le phénomène) exprime le taux maximal de mortalité par jour des abeilles, représenté par la pente de la tangente au point d'inflexion de la courbe sigmoïde de mortalité. Les trois paramètres ( $n_t$ ,  $dT50$  et  $\Delta$ ) doivent être comparés aux valeurs obtenues sur les lots témoins.



**Figure 15:** Variation de la vitesse maximale de mortalité ( $\Delta$ ) en fonction de la dose du toxique administré aux abeilles, relation directe (a) et transformation bilogarithmique linéaire (b).

A son tour cette courbe (Fig. 15) peut être décrite par l'équation suivante

$$\Delta_i - \Delta_0 = (\Delta_{max} - \Delta_0) / [1 + (d\Delta_{50}/d_i)^{n\Delta}] \quad [6]$$

$$\text{Ln} \frac{\delta}{\delta_{max} - \delta} = n\Delta \cdot \text{Ln}(d) - n\Delta \cdot \text{Ln}(d\Delta_{50})$$

$d$  = dose de toxique provoquant la vitesse  $\Delta$ .

$\Delta_0$  = vitesse observée chez les témoins.

$\delta_{max}$  = limite supérieure de la vitesse maximale.

$n_{\Delta}$  = coefficient de Hill.

$d\Delta_{50}$  = dose correspondant à jusqu'à 50% de la valeur maximale ( $\Delta_{max} - \Delta_0$ )

A partir du TL50, on peut déterminer un autre paramètre de grande importance ( $dT50$ ): la dose nécessaire pour faire diminuer de moitié le TL50 du lot témoin. Ce paramètre nous donne une information sur la dose maximale utilisable. Ces relations rendent également compte des phénomènes d'Hormesis, par lesquels de faibles doses de toxique

peuvent manifester une stimulation de la durée de vie des animaux (BOUNIAS *et al.*, en préparation).

## **5-Evaluation des perturbations biochimiques**

### **5.1-injection des insecticides**

Pour l'étude de l'impact des doses sublétales de la cyperméthrine et du fénitrothion, les injections se font sur des abeilles naissantes groupées dans des cagettes sans nourriture, au sein d'une étuve d'élevage thermostatée quelques heures avant leur utilisation. La solution à injecter est alors préparée dans de l'eau distillée, l'injection se fait à l'aide d'une microseringue Hamilton de 1  $\mu$ l dans la musculature du thorax. L'abeille maintenue par une pince souple, reçoit 1  $\mu$ l de solution, dans le muscle thoracique rapidement diffusée dans l'aorte dorsale par le flux hémolympatique. Chaque lot est alors remis dans l'étuve.

### **5. 2-Prélèvements d'hémolymphe**

0,1  $\mu$ l  $\pm$  0,01 d'hémolymphe est directement prélevé après 30 minutes, 1 heure, 2 heure, 3 heures suivant l'injection du pesticide à l'aide d'une microseringue "HAMILTON" de 1 $\mu$ l. L'hémolymphe est ponctionnée entre le 3ème et 4ème segment abdominal. Le volume de l'hémolymphe varie selon l'âge et la saison (CRAILSCHEIM,1985), mais c'est à la naissance que le volume est le plus élevé chez les abeilles. Il faut toujours s'assurer que l'hémolymphe est jaune limpide, dans tout autre cas elle ne sera pas recueillie, afin d'éviter toute impureté consécutive à une perforation intestinale. A chaque prélèvement d'hémolymphe, il s'agit de nouvelles abeilles du même lot, puisque l'abeille meurt après chaque ponction.

### **5.3-Méthode de microanalyse des glucides par chromatographie sur couche mince (BOUNIAS, 1976 ; 1983)**

### 5.3.1-Principe

L'analyse des substances en chromatographie sur couche de silice ou cellulose, est basée sur le pouvoir séparateur du couple solvant-phase solide. L'éluant entraîne ainsi les produits à doser à différentes vitesses et permet leur séparation sur la phase solide à différentes vitesses, selon leur affinité (BOUNIAS, 1983).

### 5. 3. 2-Les plaques

Elles sont fournies par les laboratoires "Merck" et mesurent (20cm/20cm). Une fine couche de silice de 0,2 mm y est déposée. Dans le cas des sucres on n'utilise pas d'indicateur fluorescent. Les plaques sont d'abord trempées dans une solution tampon phosphate (0,4 M, pH 9,2) pour permettre une séparation optimale (BOUNIAS, 1983).

### 5. 3. 3-Dosage des glucides

La gamme étalon pour le dosage sera constituée principalement de glucose et de tréhalose, qui représentent les glucides dominants dans l'hémolymphe d'abeille (BOUNIAS, 1976)

Tréhalose	20-40 mmole/l
Glucose	2-10 mmole/l
Fructose	0-5 mmole/l

Après intoxication, on déposera 0,1 µl d'hémolymphe obtenue par simple ponction. Dans le cas où on veut faire le dosage, par lot d'abeilles, on fera d'abord un mélange éthanol/pyridine (40-10 v/v). Ensuite l'hémolymphe est déposée dans un tube contenant de l'éthanolpyridine, puis on injecte l'hémolymphe dans le tube à centrifuger avec une microseringue, une fine couche de décane est déposée pour protéger l'extrait de l'oxygène de l'air. On centrifuge à 5000 tours pendant 5 minutes. Ce processus permet d'éliminer les protéines, de manière à faciliter le dosage par

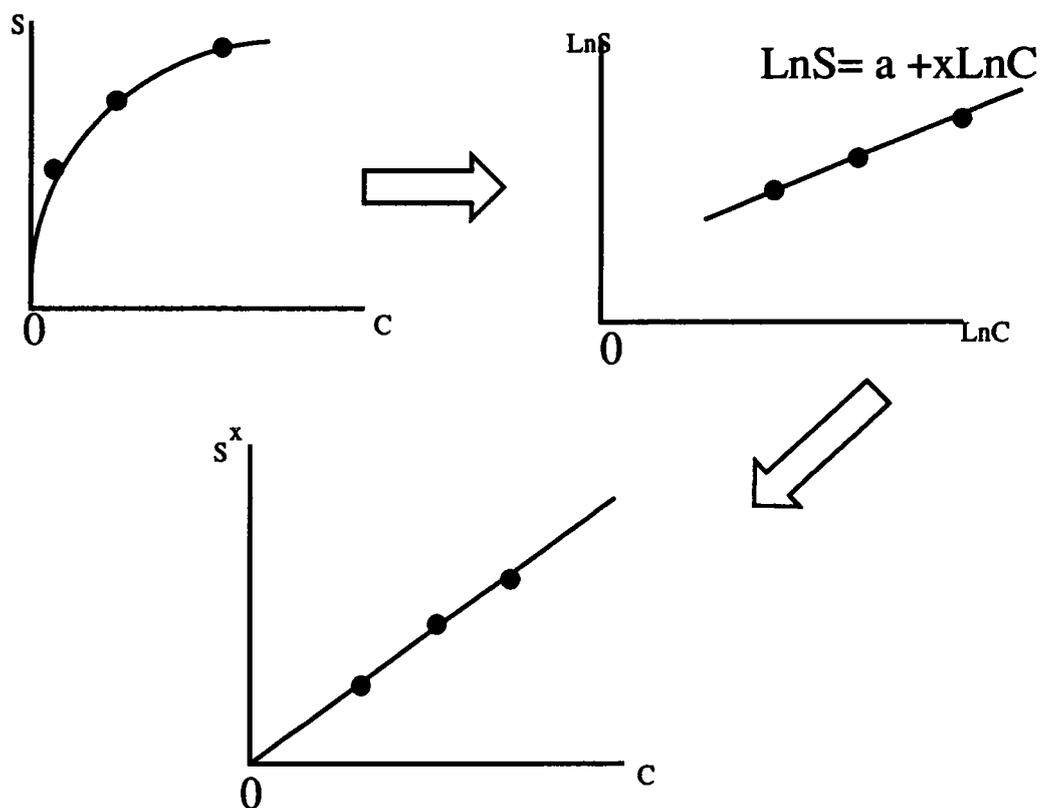
purification préalable.

**a-Elution:** elle est effectuée dans des cuves en verre rectangulaires dont les parois sont tapissées de papier imprégné du solvant pour assurer une atmosphère humide et homogène qui permet une migration uniforme des sucres. Le dosage des glucides nécessite des migrations lentes et successives. Les éluants ont été choisis compte tenu de la nature des sucres les plus abondants dans l'hémolymphe de l'abeille (glucose et tréhalose).

**b-migration:** quand l'extrait à doser comporte un nombre élevé de glucides différents à séparer, on procède généralement par deux migrations successives dans un mélange de (n-butanol/éthanol/acide acétique/eau) (40ml/30ml/10ml/20ml). Dans le cas contraire une seule migration à 14 cm avec le mélange suivant (n-butanol/ acide acétique/eau (60ml/20ml/20ml). Dans notre cas, il suffira d'une séparation rapide avec un éluant à base de (acétonitrile/n-butanol/eau (60ml/20ml/20ml) ) moyennant deux migrations à 6 cm et 8 cm.

**c-Révélation:** suivant la nature du produit à doser, un réactif spécifique sera pulvérisé sur la plaque à l'aide d'une pulvérisation à l'air comprimé. Le réactif préconisé pour les glucides est le (N-naphtyl-1-éthylène diammonium dichlorhydrate (NEDIAC) (BOUNIAS, 1980b). 30mg dans 100ml de solution composée de 95 ml d'éthanol et 5ml d'acide sulfurique concentré. La plaque est d'abord séchée dans une enceinte à l'abri de la poussière, avant d'être mise dans une étuve à 100°C pendant 20 minutes, les glucides apparaissent alors, sous forme de taches roses violettes.

**d-Lecture des plaques:** le dosage s'effectue par mesure de l'intensité de coloration des taches à l'aide d'un spectrodensitomètre (SCHIMADZU CS 9000). Chaque tache est



**Figure. 16:** Transformation linéaire théorique des surfaces des pics selon Bounias (1989 où  
 $S$ = surface des pics  
 $x$ =pente de régression  
 $C$ =concentration

traduite graphiquement par un pic proportionnel à la coloration et donc à la quantité du glucose ou du tréhalose présent dans l'hémolymphe. La longueur d'onde à laquelle les glucides révélés absorbent le plus est de 450 nm.

**e-Analyse quantitative (BOUNIAS, 1976):** Il s'agit donc d'établir, la relation  $\text{surface} = f(\text{concentration})$ . Comme il est rare que les courbes d'étalonnages soient des droites parfaites passant par l'origine, il est nécessaire que les points inconnus se situent à l'intérieur de l'intervalle des concentrations étalons afin que les déductions soient faites par interpolation. La chromatographie en couche mince classique sur plaque de verre a souvent fait appel à des relations entre surfaces des taches et le logarithme de la quantité du produit. Une transformation bilogarithmique permet de résoudre en pratique la plupart des problèmes de linéarité (Fig. 16).

Soit S le paramètre "surface des pics" et C le paramètre concentration des substances. Il est pratiquement toujours possible d'établir une droite d'étalonnage passant par l'origine d'équation  $S^x = p \cdot C$  dans laquelle l'exposant x désigne un coefficient qui permet à la fois de redresser et de dilater la courbe d'étalonnage, ce paramètre sera désigné par: coefficient d'expansion linéaire.

Connaissant la surface du pic  $S_i$  et la concentration correspondante  $C_i$ , le coefficient x est calculé d'après la forme logarithmique de l'équation de la droite:

$$x \ln S_i = \ln C_i + \ln p$$

La pente de la droite de régression donne x tandis que l'ordonnée à l'origine donne p. La droite d'étalonnage est ensuite par le calcul de régression  $S_i^x$  sur  $C_i$ , y compris le couple (S=0 ; C=0) qui en fait objectivement partie. Les surfaces des pics des substances à doser sont élevées à la puissance x et reportées sur la droite de régression.

### **1- Caractéristiques de la méthode d'analyse des glucides**

La sensibilité avec cette méthode atteint 10 picomoles en analyse quantitative, ce qui constitue une limite inférieure difficile à atteindre par d'autres voies. A titre d'exemple, l'extrapolation d'une gamme de tréhalose étalon comprise entre 2 et 16 nanomoles permet de doser un pic inconnu de 80 nanomoles avec une erreur inférieure à 1% et une gamme de glucose comprise entre 0,5 et 8 nanomoles permet de doser un pic de 20 nanomoles avec une erreur relative de 3,7% (BOUNIAS, 1983).

### **5. 4-Dosage de l'adénosine triphosphatase (ATPases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)**

Des abeilles naissantes sont mises par lot de 30 dans des cagettes avec du sirop de saccharose(50g/100ml), les groupes sont constitués d'un lot traité et d'un lot témoin. Les préparations enzymatiques sont obtenues à partir de 15 têtes d'abeilles, la dissection des différentes parties de la tête et l'homogénéisation se font à froid (4°C) dans une solution contenant 1 mM EDTA, et 10 mM tampon imidazole à pH 7,5 dans de l'eau distillée du laboratoire. Le précipité de 5ml de l'homogénat ainsi formé est centrifugé d'abord à 900g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 13 000g/20 minutes. Le volume final est déterminé par le poids initial des têtes, le rapport étant 3mg /1 ml EDTA-imidazole à pH 7,5. L'activité ATPasique est calculée par la méthode de PULLMAN *et al* (1960), détaillée par CHENG & CUTKOMP (1972) et YAP & CUTKOMP(1972).

. A 3 ml de solution à doser contenant les composés suivants:

ATP(5mM), MgCl<sub>2</sub>(5mM), NaCl(100mM), KCl(20 mM), imidazole pH 7,5 (118 mM), NADH (0,19 mM), PEP (0,5mM), pyruvate Kinase (9 unités), BSA (0,02%), lactico déshydrogénase(12 unités) et 100µl de l'homogénat provenant des têtes d'abeilles. L'activité sera évaluée en µmole/mg de protéine /heure. Pour déduire l'activité de l'ATPase Mg<sup>2+</sup>, on ajoute dans le milieu 0,85 mmole/l de ouabaine, ensuite la différence des deux activités, nous donnera celle de l'ATP (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). La lecture de la densité se fait

à l'aide d'un spectrophotomètre "BECKMAN DU" à 37°C. L'activité spécifique sera exprimée en  $\mu\text{mole Pi/ mg protéine/h}$ . Le résultat sera exprimé en % d'inhibition par rapport au lot témoin.

#### **5. 4. 1-Caractéristiques de la méthode d'analyse**

La précision photométrique du spectrophotomètre "BECKMAN DU" est de l'ordre de  $\pm 0,015$  à 1 A et une reproductibilité de  $\pm 0,0001$  à 1A avec une intégration de 2s. Quant à la sensibilité de la méthode de dosage PULLMAN *et al* (1960), elle est de l'ordre de nmoles Pi/mg protéine/h.

### **5. 5-Activité cholinestérasique (AChE)**

#### **5. 5. 1-Purification de l'enzyme AChE (E.C 3.1.17)**

Toutes les étapes qui se dérouleront durant cette expérience se feront toujours à froid 4°C. Les abeilles sont d'abord anesthésiées au CO<sub>2</sub>, aussitôt les têtes sont coupées et séparées du thorax. Elle sont ensuite mises dans une solution tampon mélangée à un détergent puissant Lubrol-PX qui permet la solubilisation de l'enzyme à 98% (BELZUNCES *et al.*, 1988) et  $10^{-2}$ M TrisHCl. L'homogénat est filtré et subit une première centrifugation à 10 000xg pendant 30 minutes, le surnageant est repris et centrifugé une deuxième fois à 10 000xg. Enfin ce dernier surnageant subit une ultracentrifugation à 100 000xg dans une ultracentrifugeuse (Beckman 50 Ti) pendant une heure ; le dernier surnageant est récupéré pour l'analyse.

#### **5. 5. 2-Essai enzymatique**

L'activité enzymatique est testée à 20°C en utilisant la méthode de dosage d'ELLMAN *et al* (1961) où dans 1ml de milieu contenant  $15 \cdot 10^{-4}$  M DTNB,  $3 \cdot 10^{-4}$  M AcSCh dans  $8 \cdot 10^{-8}$  M TrisHCl à pH 8. La réaction est suivie par dosage spectrophotométrique à 410 nm. l'activité sera exprimée en . Le résultat sera exprimé en % d'inhibition par rapport au lot

en mole/l/min.

### **5. 5. 3-caractéristiques de la méthode d'analyse**

La méthode d'analyse mise au point par ELLMAN *et al* (1961) est très sensible et applicable à de petits échantillon et à de très faibles concentrations en enzyme, le pourcentage d'erreur est de 3% pour un dosage d'une solution de  $5 \cdot 10^{-4}$  M répété 9 fois.

### **5. 6-Analyse multirésiduelle des insecticides.**

Les analyses de résidus d'insecticides ont été effectuées à l'intérieur du laboratoire de pathologie des petits ruminants et des abeilles, conformément à la méthode multirésiduelle mise au point au CNEVA/LPPRA par POURTALLIER & TALIERCIO (1969) et modifiée ultérieurement par FLAMINI (1986).

#### **5. 6. 1-Extraction**

**Abeilles et pollen:** elles sont extraites par l'acétonitrile saturé d'hexane (10%), l'addition de cet hydrocarbure provoque la désagrégation de l'épicuticule lipidique de l'abeille, fixatrice de pesticides. Cet extrait est ensuite débarrassé de la plus grande partie des pigments et lipides par une partition avec de l'hexane que l'on rejette. La phase acétonitrile ainsi purifiée est ensuite diluée dans une solution aqueuse de sulfate de sodium puis extraite à l'hexane.

**Miel:** Le miel après homogénéisation est extrait par un mélange de benzène et d'isopropanol. Ce dernier solvant est ensuite éliminé par lavages au moyen d'une solution aqueuse de chlorure de sodium.

**Cire:** Cette substance comporte un taux très élevé de lipides. Pour libérer

complètement les pesticides qu'elle pourrait renfermer, il est nécessaire de dissoudre la totalité de l'échantillon dans l'acétonitrile puis éliminer les matières grasses par deux partitions successives avec l'hexane de la même manière que pour les abeilles.

### **5. 6. 2–Purification**

Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, la phase organique (hexane ou benzène selon le substrat) est concentrée par évaporation sous vide puis déposée en tête de colonne de Florisil à teneur en eau calibrée. On procède alors à deux éluions successives au moyen de deux mélanges d'éther de pétrole et de chlorure de méthylène de polarités différentes. On retrouve dans la première fraction apolaire (20% de chlorure de méthylène) la quasi totalité des organochlorés et dans la deuxième fraction plus polaire (50% de chlorure de méthylène) la quasi totalité des autres pesticides à savoir organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse. Chaque éluant est finalement concentré sous pression réduite avant chromatographie en phase gazeuse.

### **5. 6. 3- Chromatographie en phase gazeuse**

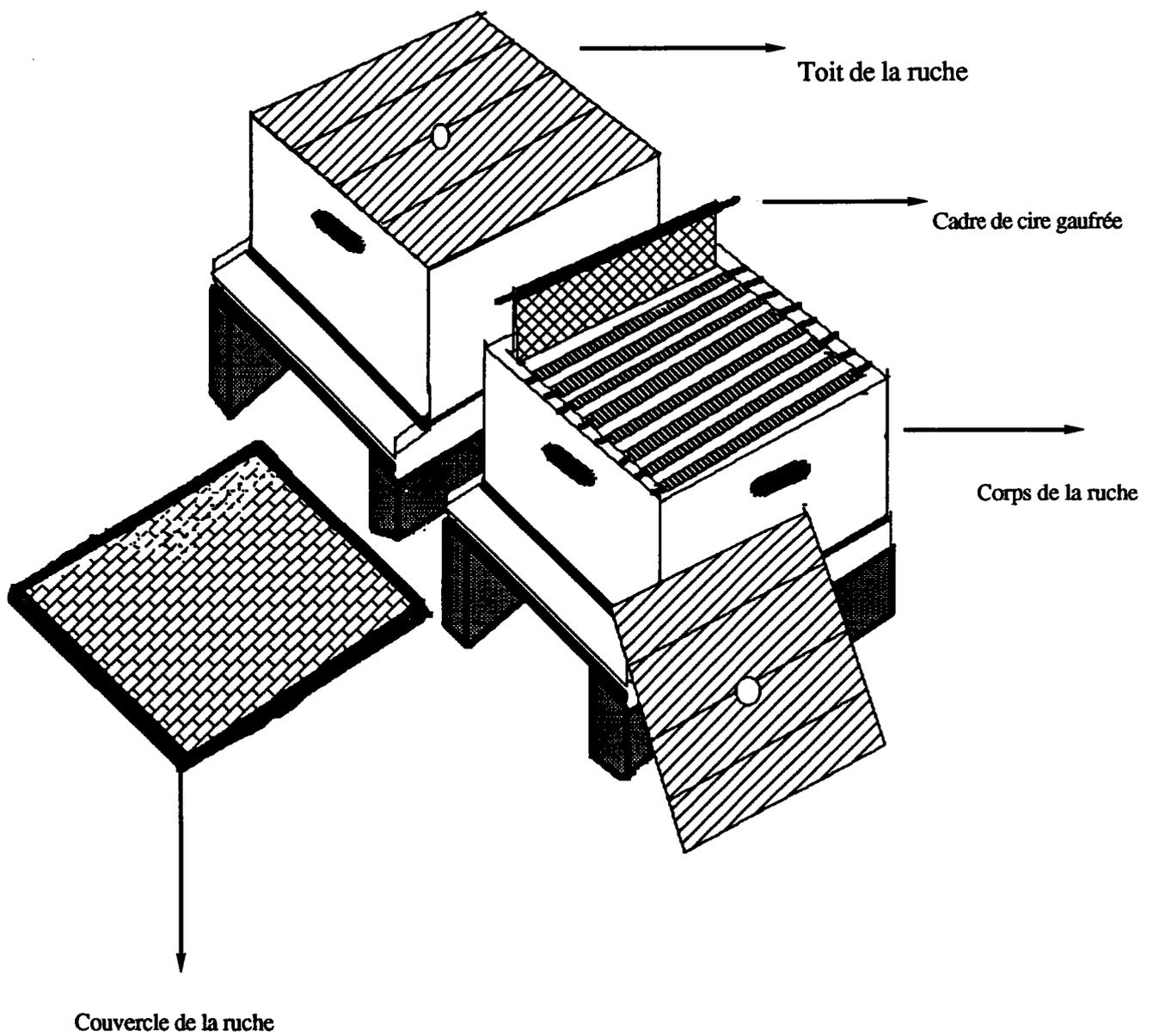
On opère avec plusieurs colonnes raccordées à deux détecteurs autonomes mais donnant des réponse simultanées. le premier est un détecteur à capture d'électrons ( $^{63}\text{Ni}$ ), très sensible aux molécules halogénées et organophosphorés. Le second détecteur est thermoïonique à flammes parallèles. La réponse finale étant constituée par par la différence des signaux engendrés par les deux flammes ionisantes. cette méthode permet de détecter une cinquantaine de pesticides. L'injection de 1 à 3  $\mu\text{l}$  de chaque éluat successivement dans le chromatographe (GC 6000, Carlo Erba instrument) Dans le cas d'une recherche ne portant que sur la cyperméthrine le protocole est basé sur une seule éluion (FLAMINI, 1986).

#### 5. 6. 4–Caractéristiques de la méthode d'analyse

Sensibilité : elle est variable selon la nature de l'insecticide. Pour le lindane la sensibilité est de l'ordre de  $10^{-3}$  picomoles et pour la cyperméthrine est de  $10^{-4}$  nmoles

Précision : le % d'erreur induit par cette méthode est de l'ordre de 5%.

**B-ESSAIS SUR LE TERRAIN**



**Figure 17:** Organisation générale d'une ruche "Langstroth"

## 1-objectifs

Partant des résultats de l'enquête écopathologique (FLECHE *et al.*, 1985) qui a permis de mettre en évidence la présence de pesticides en permanence dans les colonies, nous nous proposons d'évaluer dans les conditions les plus proches possibles de la réalité, l'effet d'une dose sub létale de cyperméthrine sur le développement des colonies.

## 2-Matériels

### 2. 1-Caractéristiques des ruches "LANGSTROTH" (Fig. 17)

La ruche fabriquée par LANGSTROTH en 1851, a connu une grande popularité dans le milieu apicole. Elle possède de nombreux avantages.

1-un cadre plus large que haut permet l'usage des ruches dite "plates"

2-les cadres sont plus faciles à désoperculer.

3-tous les éléments sont identiques contrairement à la ruche "DADANT"

4-toutes les opérations: l'arrêt de la ponte, la formation du noyau, l'élevage des reines sont aussi facilitées par l'architecture de cette ruche par rapport aux autres ruches.

5-la ruche peut contenir jusqu'à 10 cadres.

La ruche Langstroth dite aussi ruche standard présente les dimensions suivantes

⇒ 10 cadres HOFFMAN conformes 430 mm/203 mm

⇒ corps de la ruche:

-grand côté 512 mm/240 mm

-petit côté extérieur 372 mm/240 mm

-planchette de recouvrement

-toit forme couvercle de 558 mm /458 mm/114 mm, recouvert de zinc

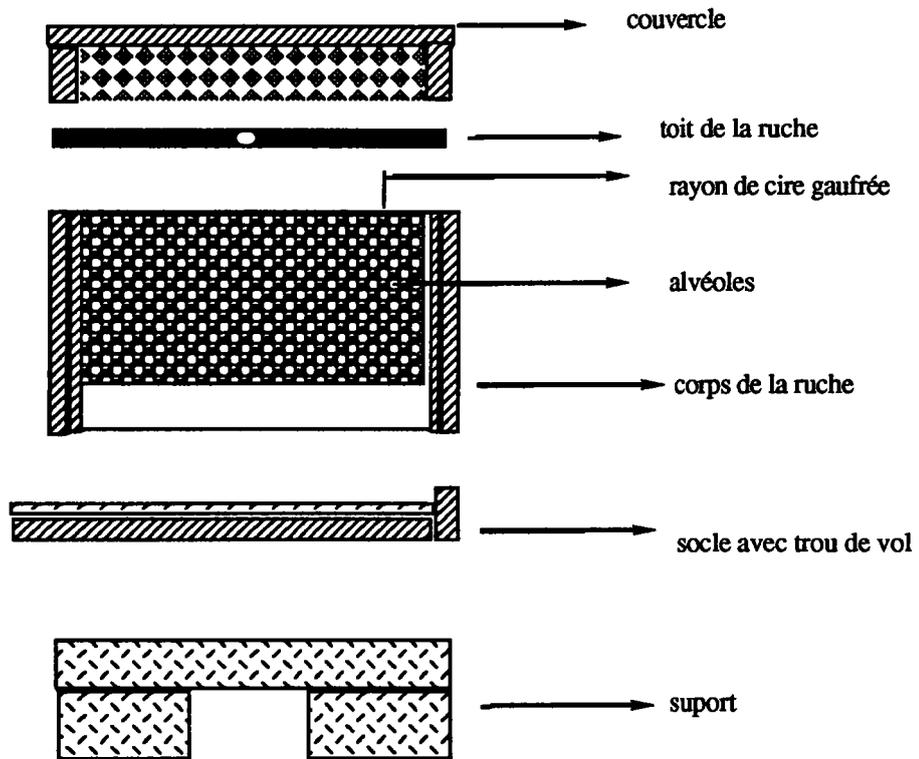
⇒ hausse (si besoin, est) sera de même dimension que le corps

⇒ plateau: des planches assemblées de 372 mm /570 mm

⇒ la ruche est déposée sur socle formé par commodité de 4 parpains (Fig. 18).

⇒ un cadre nourrisseur est inséré dans chaque ruche pour recevoir le sirop

⇒ des trappes à pollen ont été glissées dans 2 ruches pour le prélèvement et l'analyse.



**Figure 18:** Coupe transversale schématique d'une ruche "Langstroth"

### 3-Caractéristique générales du site expérimental

Quand on aborde une expérimentation sur le terrain, il est important de noter avec précision toutes les caractéristiques de l'écosystème dans lequel va se dérouler l'essai. D'autant plus que dans notre cas, l'environnement agit d'une manière directe sur le développement des colonies. Tous les facteurs biotiques et abiotiques doivent être pris en considération. En ce qui nous concerne ; nous avons retenu trois facteurs essentiels.

1-La situation géographique

2-Le climat prépondérant

3-Le couvert végétal

Les caractères pédologiques du terrain ne seront pas développés, vu l'absence d'action directe sur le développement des colonies d'abeilles.

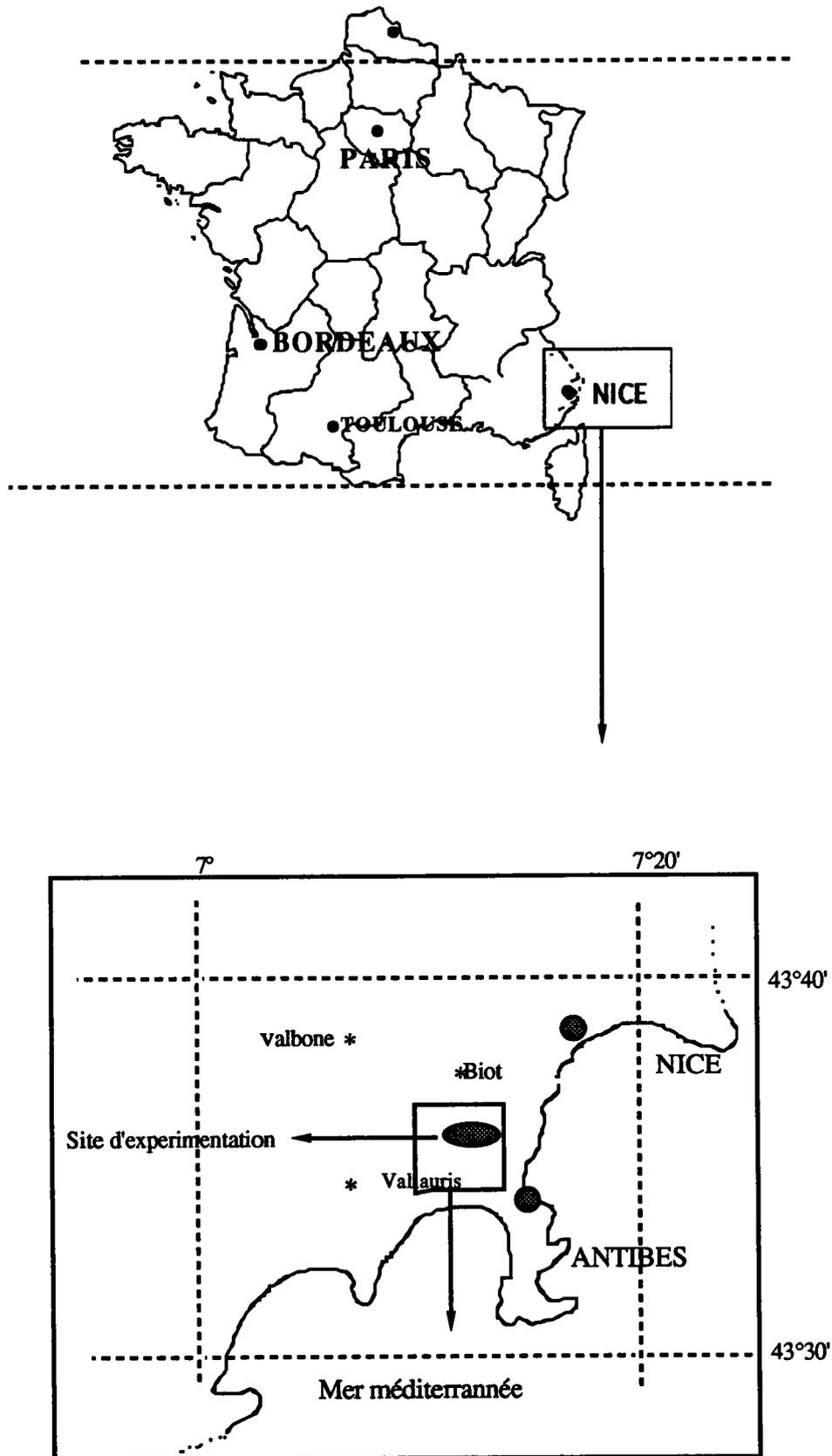
**3.1-Situation géographique:** le site de Sophia-Antipolis se trouve à 250 m d'altitude et à 13 Km de la mer, entre les parallèles 43°40' et 43° 30' (Fig. 19)

**3. 2-Données climatiques:** Le climat local est de type méditerranéen. Les saisons ne sont pas très marquées, mais seulement des changements de régime journalier. L'été est chaud et humide, l'hiver doux et humide. En plus de la température et de l'humidité qui sont particulières dans ce site, les vents locaux sont souvent assez déterminants, mais notre site se trouve abrité d'un vent local très fort " le mistral " qui prend alors une direction N.O/S.E, entraînant ainsi l'installation d'un microclimat caractérisé par un hiver plus froid, et une humidité avoisinant les 98% en été.

Les précipitations: de 700 mm à 1000 mm selon les années.

Températures: l'hiver 8°C à 12°C, l'été de 24°C à 35°C en moyenne

Le rucher sur le terrain à une orientation SE 130° S.



**Figure 19:** localisation géographique du rucher expérimental "Sophia-Antipolis" (CNEVA-LPPRA)



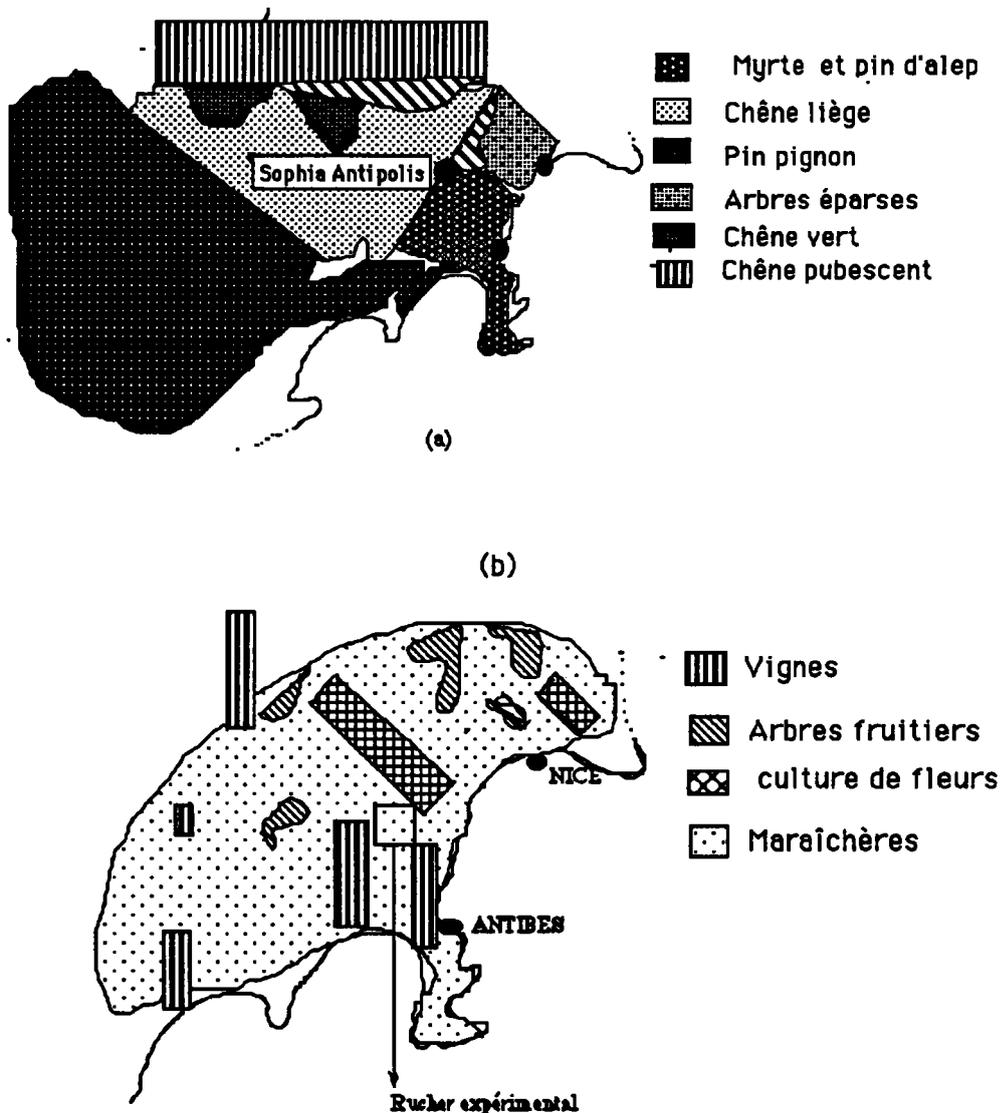
**Photo 5:** Vue d'ensemble du site expérimental à Sophia-Antipolis

**3. 3-Le couvert végétal** (Fig. 20): Il est constitué en majorité d'arbres et d'arbustes à feuilles persistantes, parmi les essences principales, on trouve:

Le chêne vert, le chêne liège, le chêne pubescent, les cistes et les myrtes.

Le tapis agricole est constitué surtout d'oliviers, de vignes et de cultures maraîchères.

Ces précisions ont été données de façon à bien connaître le type de plantes susceptibles d'être pollinisées pendant la période de pleine activité, ceci sera d'ailleurs complété par des analyses polliniques au laboratoire.



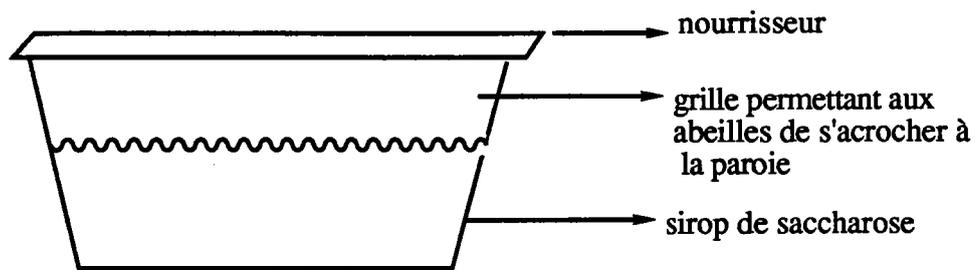
**Figure 20:** Végétation rencontrée autour du site expérimental, d'après la carte de végétation Antilles et régions. Principales essences (a), tapis végétal (b)

#### 4-Méthodologie

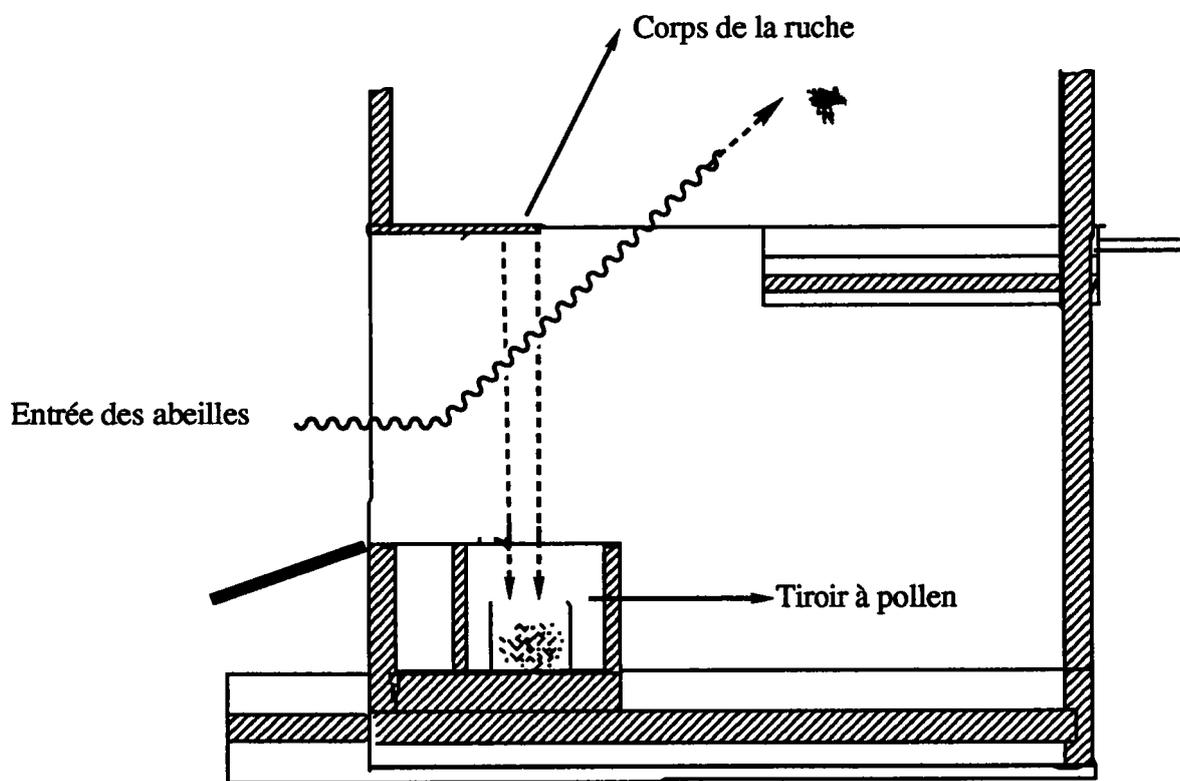
Le rucher du laboratoire constitué de 78 ruches, va nous permettre de former des essaims (paquets d'abeilles prêts à recevoir une reine et capables de se développer d'une façon autonome. A partir du mois de Février 1992, 40 ruches ont été sélectionnées et nourries intensivement afin de provoquer une augmentation de la population.

Au mois d'Avril chaque ruche a développé une population assez conséquente, prête à être divisée. Afin de récupérer les essaims, 40 ruchettes à 6 cadres, ont été posées juste derrière les ruches mères, ces ruchettes contenant de la cire bâtie (sans couvain), avec des réserves pour permettre le redémarrage et la survie de la population. Les ruchettes contenant à la fin du transvasement une partie de la population et la reine locale, seront transférées sur un autre site, situé à 6 Km du laboratoire. Il convient de vérifier, par des visites régulières que chaque ruchette est dotée d'une reine et qu'il y a effectivement ponte, et aucune reine dans les ruches "langstroth"orphelines qui formeront les " futurs essaims expérimentaux". Avant le démarrage de l'expérimentation des analyses parasitologiques et bactériologiques seront effectuées sur toutes les colonies, pour remplacer éventuellement celles qui seraient atteintes d'une maladie.

Pendant ce temps, 40 nouvelles ruches sont nettoyées, désinfectées et posées derrière les ruches expérimentales orphelines. La cire qui servira à former les cadres est passée au crible des analyses toxicologiques dans notre laboratoire, afin de s'assurer qu'il n'y a aucune pollution préalable à la cyperméthrine (dont le seul apport doit être celui introduit par le nourrissage) qui pourrait biaiser nos résultats dès le départ. Les essaims sont équilibrés, pour que les populations soient sensiblement égales avant l'arrivée des reines sœurs, sachant que le nombre d'abeilles ouvrières influe sur l'évolution de la surface du couvain (EISCHEN *et al.*, 1982). Les reines sœurs de race caucasiennes sont issues de la même mère, afin d'atténuer l'effet de la variabilité génétique qui pourrait agir sur l'homogénéité des lots. Les reines nous ont été fournies vers la mi juin par un éleveur spécialisé (G. Pradier.).



**Figure 21:** Coupe transversale schématique d'un cadre nourrisseur "Doolittle" (42,5/22/41/3 cm)



**Figure 22:** Coupe schématique d'une trappe à pollen de type "DURANTE"

L'introduction des reines dans les ruches orphelines n'est pas toujours sans incident. Tous les chercheurs et apiculteurs se heurtent au problème de l'acceptation des reines par une population hôte. Les reines arrivent au laboratoire dans de petites cagettes grillagées entourées de quelques abeilles accompagnatrices. Une fois introduites (48 heures après l'orphelinage), l'acceptation sera vérifiée de deux manières différentes: contrôle d'un début de ponte puis contrôle de la présence de la reine avant de continuer l'essai. Au bout de 3 semaines de vérification, sur 40 reines introduites 21 seulement ont été définitivement acceptées (un taux de réussite de 52%).

Ces 21 ruchettes, vont être transvasées dans 21 ruches "Langstroth" qui seront étiquetées de 1 à 21 sur la face arrière du corps de la ruche. Chaque ruche est munie de 5 cadres de cire gaufrée et un cadre nourrisseur de type Doolittle (Fig.21), 2 ruches seront munies d'une trappe à pollen (Fig. 22). Ensuite les ruches seront réparties en 3 lots:

**Lot TR:** lot traité sirop+cyperméthrine

**Lot CR:** lot témoin ayant reçu le sirop seul

**Lot C:** lot témoin ayant reçu du sirop pour le démarrage du printemps uniquement.

Les ruches sont disposées selon une orientation (SE 130°S), espacées entre elles et entre chaque lot de manière à ce qu'il y ait le moins de dérive possible (phénomène d'orientation selon lequel les abeilles se trompent de colonies. Ce problème a été atténué au laboratoire par une séparation bien déterminée entre les différents lots de façon à ce que les butineuses des 3 lots se mélangent le moins possible). La dose de cyperméthrine établie par l'enquête (FLECHE, 1986) est de 30 nmoles/l (elle correspond à la quantité régulièrement introduite dans la colonie chaque semaine). Cette dose est mélangée à un 1 litre de sirop de saccharose (500 g/1 litre d'eau) à pH 6,8, qui sera donné chaque début de semaine à chaque ruche. Les colonies sont ensuite déposées sur du grillage blanc étalé devant les ruches, pour mieux repérer les

éventuels phénomènes anormaux qui se passeraient à l'extérieur des colonies.

## **5-Les interventions sur le terrain**

### **5.1-Sur les abeilles adultes**

**5. 1. 1-Mortalité:** Des bandes de grillages de type moustiquaire, sont installées devant les colonies en permanence ; le nombre de mortes est décompté et noté chaque jour pour chaque colonie des 3 lots. Ces mortes sont échantillonnées par lot et mises au congélateur immédiatement en attendant l'analyse. Il est important dans la mesure du possible, de procéder aux analyses le jour même.

**5. 1. 2-Activité de la colonie:** comptage des entrées et sorties au trou de vol pendant une minute par colonie une fois par semaine et toujours à la même heure.

**5. 1. 3-Comportement:** l'observation du comportement des abeilles est effectuée une fois par semaine, sans oublier les visites de routine quotidienne qui permettent aussi de contrôler le comportement, et de noter tout phénomène suspect. Parmi les paramètres que nous avons retenus pour l'étude des anomalies du comportement on trouve:

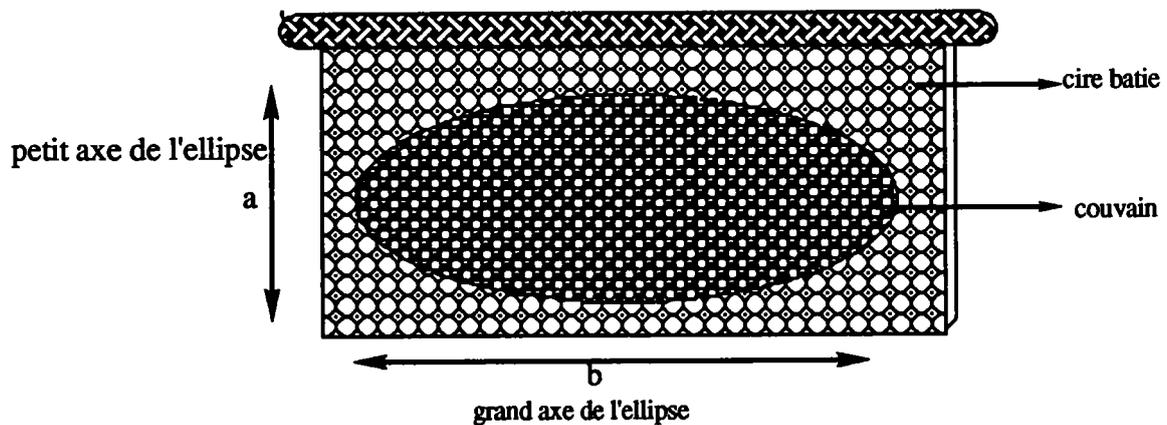
Agressivité	Abeilles montant le long de la paroi
Abeilles se traînant devant les ruches	Abeilles groupées " faisant la barbe"
Abeilles grimant aux brins d'herbes	Abeilles se groupant pour se nourrir
Diarrhées	Abeilles petites et noires
Bataille à l'entrée	Abeilles aux ailes écartées
Abeilles aux ailes asymétriques	Abeilles mal formées devant la ruche
Nymphe et larves devant les ruches	

**5. 1. 4-Récolte** et pesée du miel s'il y a lieu en fin de saison, colonie par colonie.

**5. 1. 5-Analyses:** Prélèvement de quelques abeilles vivantes par ruche et par lot pour les analyses biochimiques, pathologiques et toxicologiques tous les 15 jours.

### 5. 2-Sur le couvain

La surface occupée par le couvain sur un cadre a souvent la forme d'une ellipse par analogie, FRESNAYE & LENSKY.( 1961) ont pu estimer la surface du couvain d'une manière générale par la formule  $S = (a/2 \times b/2) \times \pi$  où a est le petit axe et b la grand axe de l'ellipse formée par le couvain. Nous avons retenu cette méthode pour la facilité d'utilisation qu'elle présente sur le terrain et pour le faible pourcentage d'erreur d'estimation qui est de 13%.





**Photo 6:** Montage de prise de photos du couvain, pouvant être accroché à un véhicule sur le terrain.

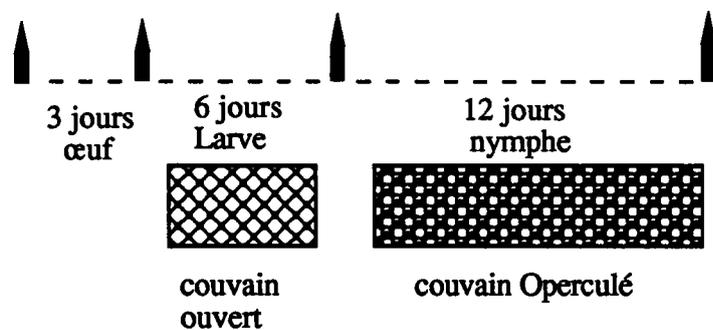
## 6-Observation des perturbations du développement larvaire

### 6. 1-Principe:

Si la surface du couvain nous permet de connaître la fécondité de la reine, la prise de photos va nous permettre de vérifier les éventuels effets défavorables, de la cyperméthrine sur la descendance. Environ 200 cellules par face de cadre et sur 2 cadres par colonie, seront pris en photo tous les 8 jours avec un dispositif conçu au laboratoire (photo. 6) dont les détails sont donnés par la figure.23. L'objectif est de suivre alvéole par alvéole, le développement du couvain par repérage dans le temps, des operculations, afin de mettre en évidence les éventuelles anomalies d'éclosion. La mesure de la surface du couvain ainsi que la prise des photographies, nous permettront de voir les effets de la cyperméthrine sur le développement du couvain.

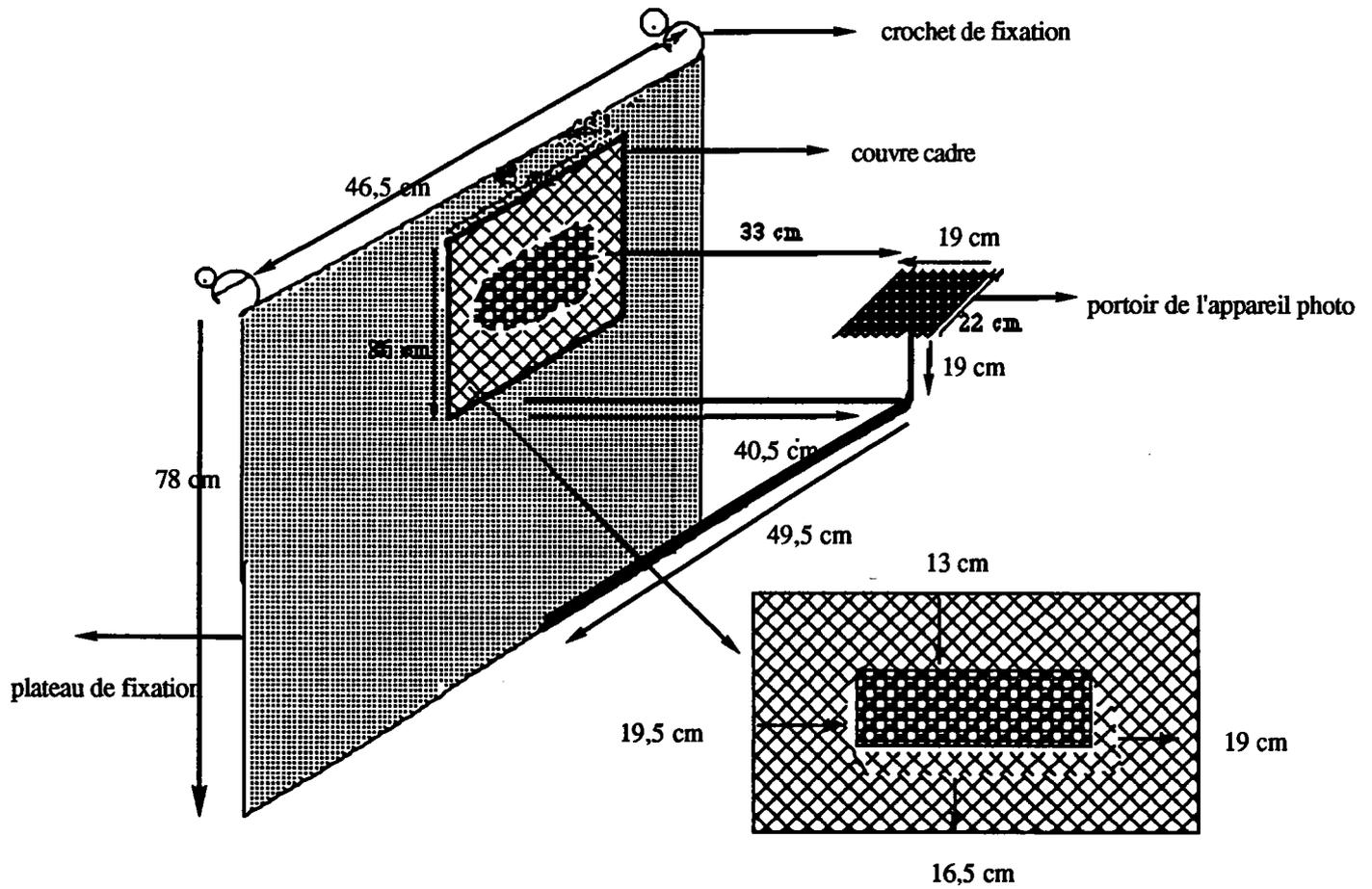
Pour cela, dans chaque ruche 2 cadres sont identifiés par des couleurs différentes. Sur la première photo de chaque pellicule: la date, le n° de la semaine, le numéro de la pellicule, et le numéro de la colonie doivent apparaître.

En se basant sur la durée du cycle évolutif de l'abeille ouvrière qui dure 21 jours, Les prises de photos ont commencé dès le premier jour d'operculations. Pour chaque cadre ce sera le jour J0 de l'operculation qui, devrait durer en moyenne 12 jours (Fig. 24).



**Figure 24:** Cycle évolutif d'une ouvrière d'*Apis mellifera*

## 6. 2-Dispositif



**Figure 23:** Dispositif de prise de photos du couvain, pouvant être accroché à un véhicule

En comptant 15 jours après le début de l'operculation, l'alvéole s'il a suivi un développement normal, devrait se trouver désoperculé ; si l'alvéole est toujours operculé, on peut estimer que la ponte précédente a avorté et a été ensuite remplacée par un œuf. Sachant que les deux premiers stades de développement durent 9 à 10 jours, les deux semaines d'intervalle entre deux photos successives sont donc suffisantes pour une nouvelle operculation. Pour la lecture des photos, chaque alvéole est identifiée par ses coordonnées en abscisses et en ordonnées sur une grille disposée sur l'écran de projection des diapositives. On peut ainsi suivre la succession des générations dans chaque alvéole, un allongement ou un raccourcissement de l'operculation éventuellement. Par projection des diapositives, on peut ainsi comparer deux photos successives d'une même face, prises à une semaine d'intervalle. L'appareil qui a servi à prendre des photos est de type (Minolta X500 ; pellicule couleur 36 poses, 400 Asa).

L'évolution interne des ruches sera évaluée par d'autres paramètres pris directement sur les ruches, tels que:

- le nombre de cadres à couvain
- le nombre total des cadres
- fréquence des changements des reines
- enfin le taux de survie des ruches à la fin de l'expérience

### **7-Données climatiques**

⇒ Relevés de l'hygrothermie: la température et l'hygrométrie sont relevées en continu à l'aide d'un thermohygromètre (SIGMA) étalonné par le centre météorologique de Nice. Le remplacement des feuillets se faisant une fois par semaine. La moyenne se fera sur les valeurs minimales et maximales chaque semaine.

⇒ Le relevé des précipitations se fait à l'aide d'un pluviomètre conique standard à lecture directe.



**Photo 7:** Exemple d'une portion d'un couvain témoin prise sur le terrain à la 30 ème semaine.

30: 30ème semaine

R12: ruche N°12

I: deuxième cadre

1a: première surface du cadre

## 8-Les analyses statistiques

### 8.1-Comparaison de moyennes

Soit la moyenne arithmétique  $m$ , et  $x$  la variable, l'écart-type ( $S$ ) d'un ensemble de  $n$  valeurs on a alors l'écart type estimé de la population:

$$S = \left[ \frac{\sum (x-m)^2}{(n-1)} \right]^{1/2}$$

Lorsque la répartition de deux valeurs appartenant à deux séries  $S_1$  et  $S_2$ , constituées respectivement de  $n_1$  et  $n_2$  éléments, obéit à une loi normale, la comparaison de leur moyenne  $m_1$  et  $m_2$  se fait à l'aide de test de student "t", dans lequel l'écart réduit s'exprime comme suit:

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{S}$$

Soit

$\delta$ : erreur standard de la différence des moyennes

$S^2$ : Variance standard

l'estimation de la variance est:

$$\delta^2 = \frac{\sum_1 (x_1 - m_1)^2 + \sum_2 (x_2 - m_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$S^2 = \frac{\delta_1^2}{n_1} + \frac{\delta_2^2}{n_2}$$

Avec le degré de liberté,  $v = n_1 + n_2 - 2$  on peut lire sur la table, pour la valeur de "t" calculée, Les seuils de risques correspondants. Nous retiendrons les seuils suivants, notés (P):

$P < 0,01$  la différence entre les moyennes est hautement significative

$P < 0,05$  la différence entre les moyennes est t significative

## 8. 2-Corrélations et régressions

On appelle coefficient de corrélation entre une variable contrôlée X et une variable dépendante Y le paramètre r, dont le carré  $r^2$  ou coefficient de détermination, exprime la part de la variabilité de Y strictement due à l'existence d'une relation linéaire:  $Y = a + bx$

$$r^2 = \frac{\text{COV}(X_i * Y_i)}{\sigma_{X_i}^2 * \sigma_{Y_i}^2}$$

$$0 < r < 1$$

$r = 0$ : aucune relation

$r = 1$  ou  $-1$ : Corrélation linéaire parfaite (théorique)

COV= covariance de X et de Y

La droite de régression linéaire permet de calculer la pente et l'ordonnée à l'origine

$$y = bx + a$$

b= coefficient directeur de la droite, ou pente de régression linéaire

a= ordonnée à l'origine

i: indice des variables X et Y

La variabilité de la pente est donnée par l'expression de sa variance:

$$\sigma_b = \left( \frac{(b/r)^2 - b^2}{N - 2} \right)^{1/2}$$

La comparaison de deux pentes  $b_1$  et  $b_2$ , s'effectue au moyen de la formule

$$t = (b_1 - b_2) / \sigma_{b1,2}$$

Le seuil de probabilité associé à la signification du coefficient de corrélation est donnée par l'expression de "t".

$$t = \left( \frac{(n-2) r^2}{1 - r^2} \right)^{1/2}$$

n-2: degré de liberté

## **IV-RESULTATS**

**A-EVALUATION DE LA TOXICITE AU LABORATOIRE**

## 1-Toxicité aiguë

### 1.1-Résultats

#### 1.1.1-Classification de la cyperméthrine et du fénitrothion

Les DL50 calculées au bout de 24 heures par la méthode des probits, permettent de classer la cyperméthrine (0,38 nmoles/abeille) et le fénitrothion (0,97 nmoles/abeille), parmi les produits hautement toxiques pour les abeilles selon l'échelle établie par ATKINS *et al* (1981). Le tableau 4 résume les DL50 (24h, 48h et 72h) calculées pour la cyperméthrine et le fénitrothion.

**Tableau 4:** Tableau récapitulatif des différentes DL50 de la cyperméthrine et du fénitrothion déterminées par la méthode de Finney. Les écart types ( $\sigma$ ) sont donnés pour N=5 déterminations.

Temps (heures)	DL 50 (nmoles/abeille)	
	Cyperméthrine	Fénitrothion
24	0,38 (0,07)	0,97(0,12)
48	0,28 (0,02)	0,74 (0,08)
72	0,14 (0,03)	0,34 (0,04)

#### 1. 1. 2-Toxicité des abeilles en fonction de l'âge et de l'interaction cyperméthrine-VPC

En analysant le tableau 5, plusieurs remarques s'imposent:

D'abord, il est certain qu'aucune classe d'abeilles n'est à l'abri d'une intoxication, ensuite les abeilles naissantes paraissent plus vulnérables que les abeilles prises d'une manière aléatoire au sein de la ruche, qui constituent une population d'individus de différents âges. Les DL50 calculées sur ces deux groupes "distincts" d'abeilles (Tab. 5) présentent effectivement des différences significatives ( $P < 0,05$ ). En ce qui concerne la cyperméthrine la DL50/24h varie de 0,38 nmoles/abeille pour les abeilles naissantes et à 0,42 nmoles/abeille pour les abeilles tout venant. De même pour le fénitrothion les

DL50/24h présentent des différences significative au seuil ( $P < 0,05$ ), 0,97 nmoles/abeille pour les abeilles naissantes et 1,88 nmoles/abeille pour les abeilles tout venant.

**Tableau 5:** Toxicité des abeilles prises dans une population d'âge différent Les moyennes ( $\bar{x}$ ) et les écarts-types ( $\sigma$ ) ont été calculés pour  $N = 6$  mesures.

	DL50 /24h nmoles/abeille	
	Cyperméthrine (N=6) $\bar{x} \pm \sigma$	Fénitrothion (N=6) $\bar{x} \pm \sigma$
Abeilles naissantes	0,38 $\pm$ 0,021	0,97 $\pm$ 0,031
Abeilles tout venant	0,42 $\pm$ 0,01	1,88 $\pm$ 0,11
Abeilles naissantes + maladie noire	0,10 $\pm$ 0,013	
Différence significative au seuil ( $P < 0,05$ )	Oui	Oui

En présence du virus de la maladie noire, la DL50 de la cyperméthrine est diminuée de façon significative. Puisqu'elle passe de 0,38 à 0,10 nmoles/abeille. On peu donc dire qu'il y a un effet multiplicatif de la toxicité d'un facteur  $k = 3,80$ .

### 1.1.3-Toxicité aiguë de la cyperméthrine et du fénitrothion administrés purs ou sous leur formulation commerciale.

Il semble donc d'après les résultats (Tab. 6), que les produits purs soient plus toxiques que leur formulations commerciales si on se limite aux DL50/24h, qui sont significativement différentes au seuil ( $P < 0,05$ ). Ainsi la cyperméthrine voit sa DL50 varier dans un rapport de 1 à 1,63 et la DL50 du fénitrothion varier dans les proportions de 1 à 1,41.

**Tableau 6:** Toxicité comparée des principes actifs et des préparations phytosanitaires commercialisés. Les moyennes ( $\bar{x}$ ) et les écarts-types ( $\sigma$ ) ont été calculés pour  $N = 6$  mesures.

		DL 50 /24h nmoles/abeille $\bar{x} \pm \sigma$	Différence significative Test student ( $p < 0,05$ )
Cyperméthrine	Principe actif (cyperméthrine)	0,38± (0,03)	Oui
	cymbush: Cyperméthrine 100g/l	0,62± (0,012)	
Fénitrothion	Principe actif	0,97± (0,08)	Oui
	Follithion: 550g fénitrothion/l	1,37± (0,031)	

## 1. 2-DISCUSSION

L'intérêt de déterminer la toxicité aiguë d'un produit, consiste à apporter une réponse rapide sur la toxicité intrinsèque à court terme d'un insecticide vis à vis de l'abeille. Cette réponse permet effectivement de classer les insecticides dans une échelle de toxicité relative selon leur DL50 calculées au laboratoire. Toutefois comme nous venons de le voir la DL50 est sujette à des variations en fonction de plusieurs facteurs. L'exemple des différentes DL50/24h relevées dans la littérature (Tab.7) vient confirmer cette variabilité ainsi que la difficulté de comparaison entre les résultats obtenus par différents auteurs.

**Tableau 7:** Différentes DL50/24h de la cyperméthrine sur *Apis mellifera* relevées dans la littérature.

Auteurs	DL50/24h de la cyperméthrine (nmole/ab)
BYRDY <i>et al</i> (1989)	0,33
MURRAY(1985)	0,57
NIJIMA & OSAWA(1985)	0,72
STEVENSEN <i>et al</i> (1984°)	0,012
DL50 d'après nos travaux	0,38

En effet, Les abeilles paraissent plus sensibles aux toxiques à l'éclosion que les abeilles adultes (LADAS, 1972 ; MACKENZIE & WINSTON, 1989) et également en vieillissant (DELABIE *et al.*, 1985b ; WAHL & ULM, 1983). Même si les abeilles à l'éclosion possèdent plus de vitamines (HAYDAK & VIVINO, 1943), elles restent assez pauvres en enzymes de détoxification et en protéines (SMIRLE & WINSTON, 1988). Dans les dix premiers jours, les abeilles ont besoin d'une nourriture riche en pollen: un déficit qualitatif ou quantitatif du pollen à ce stade, peut augmenter leur sensibilité aux agressions externes provoquées par les insecticides (WAHL & ULM, 1983). En vieillissant, les abeilles s'appauvrissent en

protéines et deviennent plus vulnérables. La physiologie entre les abeilles d'été et les abeilles d'hiver (CRAILSHEIM, 1986) pourrait agir sur la variabilité de la DL50. Les conditions d'expérimentations peuvent modifier la toxicité d'un produit vis à vis des abeilles ou d'autres animaux d'ailleurs, la toxicité de la deltaméthrine par exemple est inversement proportionnelle à la température (BOS & MASSON, 1983 ; FAUCON *et al.*, 1986a).

Au laboratoire les estimations de DL50/24h de la deltaméthrine par ingestion varient de 0,118 nmoles/abeille (ATKINS *et al.*, 1981) à 1,18 nmoles/abeille (BOS & MASSON, 1983). Nous venons aussi de démontrer que la DL50 varie selon que l'on utilise les insecticides purs ou sous leur formulation commerciale, il est vraisemblable que les adjuvants de fabrication interviennent en modifiant leur toxicité envers les abeilles. C'est ainsi que la comparaison des données de la littérature devient difficile à cause des résultats disparates concernant les valeurs de la DL50 pouvant provenir des différentes facteurs comme ceux cités ci dessus entre autres.

BOS & MASSON (1983), DELABIE *et al* (1985a et 1985b) ont démontré que l'effet répulsif des insecticides dépend de leur conditionnement. L'association pathogène-insecticide, réalisée dans le cadre de nos essais par l'effet conjoint entre virus de la maladie noire (VPC) et la cyperméthrine, diminue significativement la DL50. La toxicité de la cyperméthrine est amplifiée d'un facteur ( $k=3,8$ ). MORSE *et al* (1965) ont noté une recrudescence de la loque américaine (*Bacillus larvæ*), et du couvain sacciforme (autres maladies de l'abeille) suite à un traitement au carbaryl dans la région New Yorkaise. Mais LADAS (1972) a montré que la DL50 du DDT épandu de façon topique en l'absence d'infection à la "Nosema" était bien inférieure à la DL50 chez des abeilles avec infection. De même GILLIAM (1973) a remarqué que le couvain plâtré semble être imputable à un stress apparaissant au sein des colonies d'abeilles, suite à une intoxication sub létale due aux insecticides répandus lors des traitements sur des champs voisins. Alors que ATKINS *et al* (1981) ont constaté que chez des colonies d'abeilles atteintes de la loque américaine (*Bacillus larvæ*), la maladie était sans effet

sur la réaction des adultes au carbaryl, au malathion et au lindane. La discussion entre chercheurs au sujet des interactions probables existant entre les insecticides et les pathogènes est donc toujours ouverte. Le virus de la paralysie chronique ou maladie noire est très fréquemment présent à l'état latent dans les colonies. La maladie peut se manifester durant toute la période d'activité de la colonie. Traditionnellement considérée comme une maladie de printemps, favorisée par un déséquilibre alimentaire (hivernage sur du miellat, carence en pollen), elle a tendance, ces dernières années à prendre de l'ampleur plus tardivement dans la saison apicole, en pleine miellée voire à l'automne (Enquête CNEVA-LPPRA, non publiée). Nous ne connaissons pas exactement par quel processus le virus passe à travers la paroi intestinale vers l'hémolymphe, pour atteindre enfin les centres nerveux. Mais à la lumière des travaux qui ont été effectués au laboratoire sur la maladie noire (GIAUFFRET & DUTHOIT, 1966a, 1966b, 1969 ; GIAUFFRET & LAMBERT, 1972.) nous pouvons envisager que la cyperméthrine amplifie l'action du virus en deux étapes:

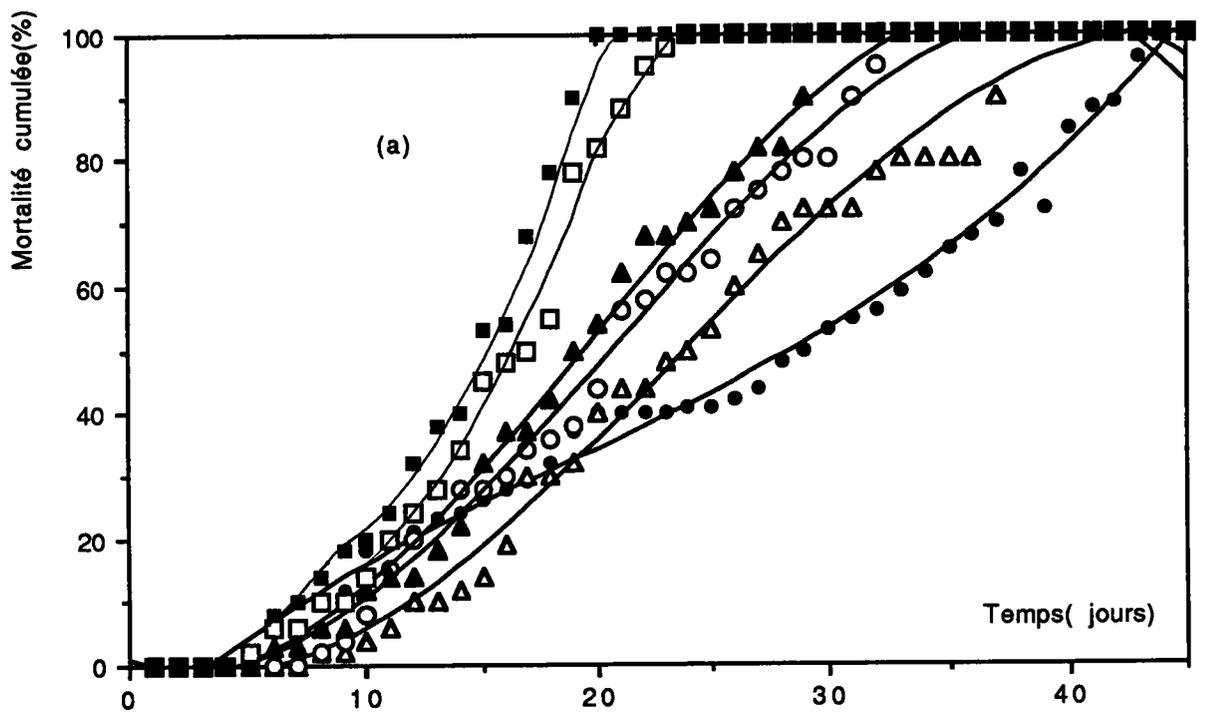
➔ **Hypothèse sur le mécanisme d'interaction entre la cyperméthrine et la virose**

1-La paroi intestinale sous l'effet de la carence alimentaire deviendrait pauvre en lipides: ceci rendrait possible alors le passage du virus vers l'hémolymphe. Or, en cas d'intoxication aux pyréthrinoïdes le métabolisme lipidique se trouve altéré (BOUNIAS *et al.*, 1985a ; M'DIAYE & BOUNIAS, 1993) et peut provoquer le même phénomène que celui observé avec des colonies très affaiblies sur le terrain.

2-Il a été montré que les pyréthrinoïdes agissent d'une manière significative sur le système immunitaire en diminuant essentiellement la teneur en lysozymes et le pouvoir phagocytaires des œnocytes des insectes (BENZ, 1971 ; VAIL *et al.*, 1972 ; BOMAN, 1989 ; RICHTER & FUXA, 1984), ceci pourrait être la cause d'une prolifération du virus à l'intérieur

de l'organisme. Y a-t-il un autre lieu de coopération entre les deux puisqu'ils attaquent ensemble le système nerveux, et s'il y a synergie à quel niveau et comment s'opère-t-elle ? autant de questions qui demandent effectivement des recherches plus poussées afin d'élucider ce phénomène.

En conclusion, Il est important aujourd'hui de noter que la DL50 est insuffisante pour cerner la réelle nocivité d'un produit sur les abeilles. 30 abeilles par cagette, ne pourront jamais simuler les interactions qui existent entre les différents individus au sein d'une ruche et dont dépend le comportement de chaque individu. La DL50 a été régulièrement critiquée quelle que soit l'espèce ; elle ne peut être considérée comme une constante biologique à cause de sa variabilité en fonction de plusieurs facteurs: l'âge, la souche, le sexe, la température, la saison, l'alimentation et la méthode d'administration (ZBINDEN & FLURY-ROVERSI., 1981 ; CHANTER & HEYWOOD, 1982). Il est donc nécessaire de trouver une alternative à la DL50, en particulier en ce qui concerne les tests sur l'abeille où le problème est beaucoup plus complexe, car en plus des facteurs cités ci-dessus, l'abeille est un animal social où les interactions entre les différents individus de la ruche se produisent tout le long de leur vie, ce dont il faut tenir compte. Comment peut-on interpréter la DL50 qui est calculée sur des abeilles de printemps qui vivent en moyenne 40 jours par rapport à celle des abeilles d'hiver qui vivent 5 à 6 mois en moyenne ? Les directives telles que celles proposées par la Commission des Essais Biologiques restent insuffisantes et font abstraction de plusieurs facteurs, dont ceux déjà cités , et d'autres que nous verrons plus loin. Dans les pages qui suivent nous allons appliquer comme alternative à la DL50 une nouvelle méthode qui présente ses avantages et ses inconvénients, mais dont l'originalité est qu'elle intègre le facteur "temps" sur toute la durée de vie des abeilles en cagettes et ne dépend pas comme la DL50, du choix arbitraire d'une durée limitée entre l'administration du toxique et les observations de mortalité (BOUNIAS, 1989).



**Figure 25:** Courbes de mortalité cumulée des abeilles soumises à une alimentation continue avec différentes concentrations de cyperméthrine: (●) Témoin ; (Δ) 0,012 μmoles/l, (○) ; 0,024 μmoles/l ; (▲) 0,048 μmoles/l, (◻) 0,096 μmoles/l, (■) 0,192 μmoles/l. Chaque lot contenant 100 abeilles.

## 2-Evaluation de la toxicité du fénitrothion et de la cyperméthrine selon Bounias

### 2. 1-Résultats

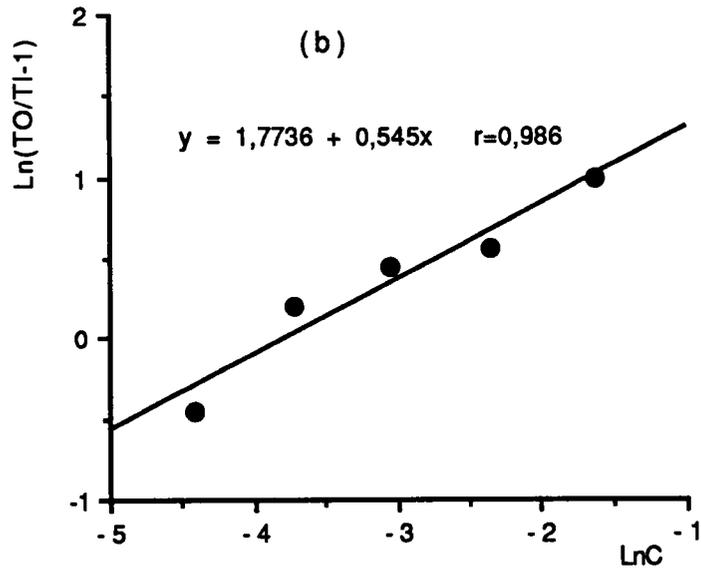
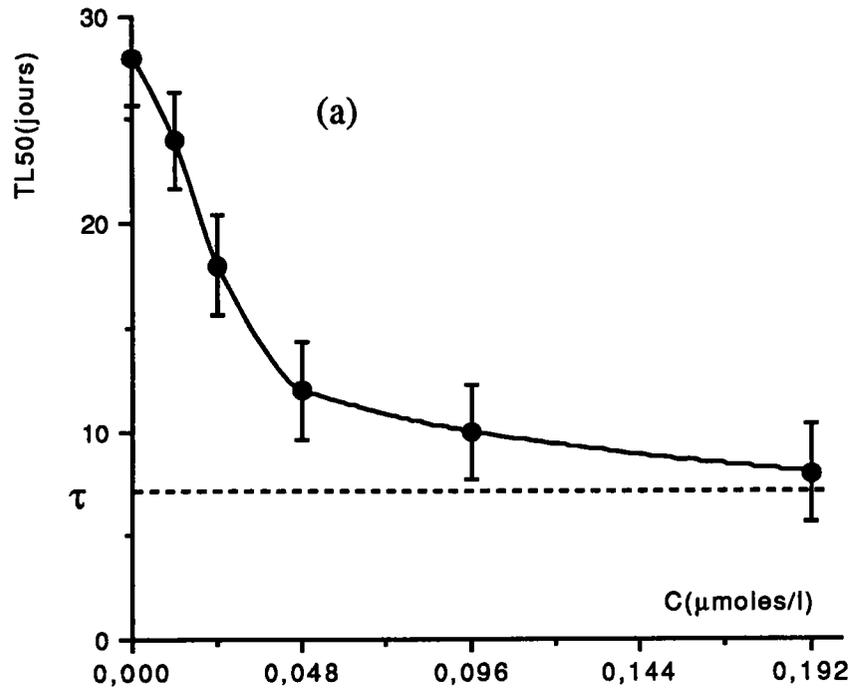
#### 2. 1. 1-La cyperméthrine

La méthode (BOUNIAS, 1989 ; 1990), fait appel à l'analogie des courbes de mortalités à celles d'une cinétique enzymatique obéissant au modèle mathématique de Hill. L'Académie des Sciences a admis la justification théorique du fait que la mort est le terme d'un processus cinétique et que ce phénomène résulte de l'action d'une "population" de systèmes enzymatiques. Afin que la comparaison soit aisée, les deux insecticides seront testés aux mêmes doses. La présentation des courbes mortalité (Fig. 25) obtenues chez les témoins et pour 4 doses différentes de cyperméthrine. Les abeilles témoins ont survécu jusqu'au 42ème jour, celles recevant 0,024  $\mu\text{moles/l}$  35 jours et enfin pour celles qui ont reçu 0,192  $\mu\text{moles/l}$  la mortalité était totale au bout de 18 jours. Les propriétés des diverses courbes de mortalité peuvent être décrites par les 2 paramètres de l'équation de Hill (nt, TL50)

**nt:** coefficient de Hill et

**TL50:** temps de demi-survie auxquels on peut adjoindre facultativement:

$\Delta$ : Vitesse de mortalité de la population, qui regroupe les deux paramètres précédents en une seule expression, ascendante en fonction des doses. L'expression des TL50 en fonction des concentrations de la cyperméthrine, présente l'allure d'une branche hyperbolique (Fig. 26a) descendant asymptotiquement, en première approximation, vers la valeur 0. Son équation peut être définie par analogie avec celle des mécanismes généraux d'inhibition enzymatique. La transformation bilogarithmique conduit à une droite de pente nt et d'abscisse à l'origine dT50 (Fig. 26b). Les valeurs expérimentales ont permis de calculer à partir de 4 couples de mesures avec un coefficient de corrélation ( $r= 0,986$ ),  $nt = (0,545 \pm 0,12)$  dT50= 0,028  $\mu\text{moles/l}$  (dose à laquelle le temps nécessaire pour obtenir 50% d'individus morts est réduit de moitié par rapport au lot témoin.



**Figure 26:** Variation du temps correspondant à 50% de mortalité (TL50) en fonction des concentrations de la cyperméthrine.

To: TL50 du lot témoin

Ti: TL50 du lot traité à la dose i

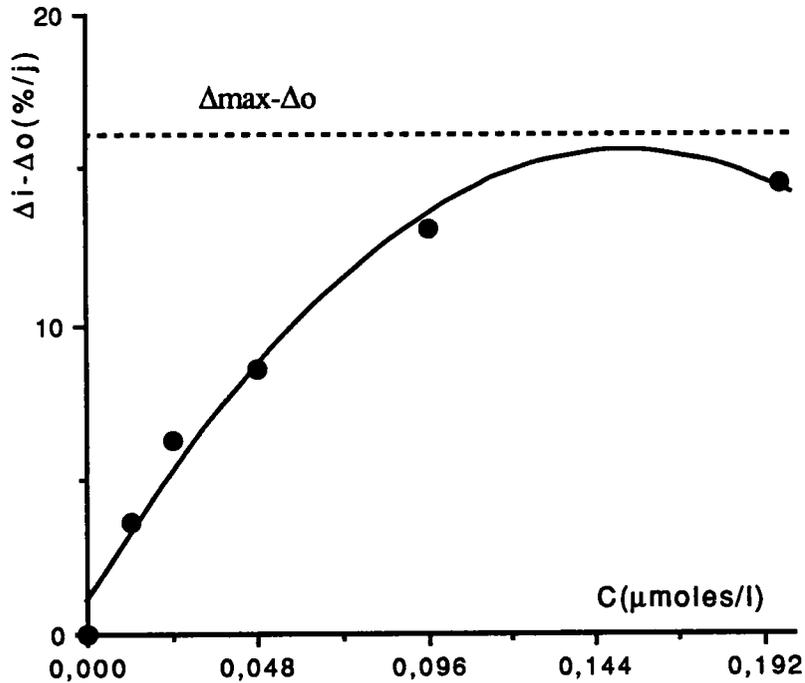
a: relation directe

b: relation bilogarithmique linéaire

**Tableau 8:** Paramètres algébriques dérivants de l'équation de Hill, appliquée à la courbe de mortalité des abeilles nourries par du sirop à diverses concentrations de cyperméthrine.

C ( $\mu\text{moles/l}$ )	(N)	TL50(jours) ( $\sigma$ )	nt ( $\sigma$ )	$\Delta$ (%/jours)
0	(4)	28 (1,2)	3,97 (0,15)	1,16
0,012	(4)	24 (2)	4,10 (0,25)	4,7
0,024	(4)	18 (3)	4,18 (0,36)	7,27
0,048	(4)	12 (1)	4,37 (0,35)	9,64
0,096	(4)	10 (2)	6,68 (0,2)	14,20
0,192	(4)	8 (2)	6,75 (0,08)	15,60

x: moyenne, ( $\sigma$ ): écart type, TL50: temps létal 50%, nt: coefficient de Hill,  $\Delta$ : vitesse de mortalité, N: nombre de répétitions.

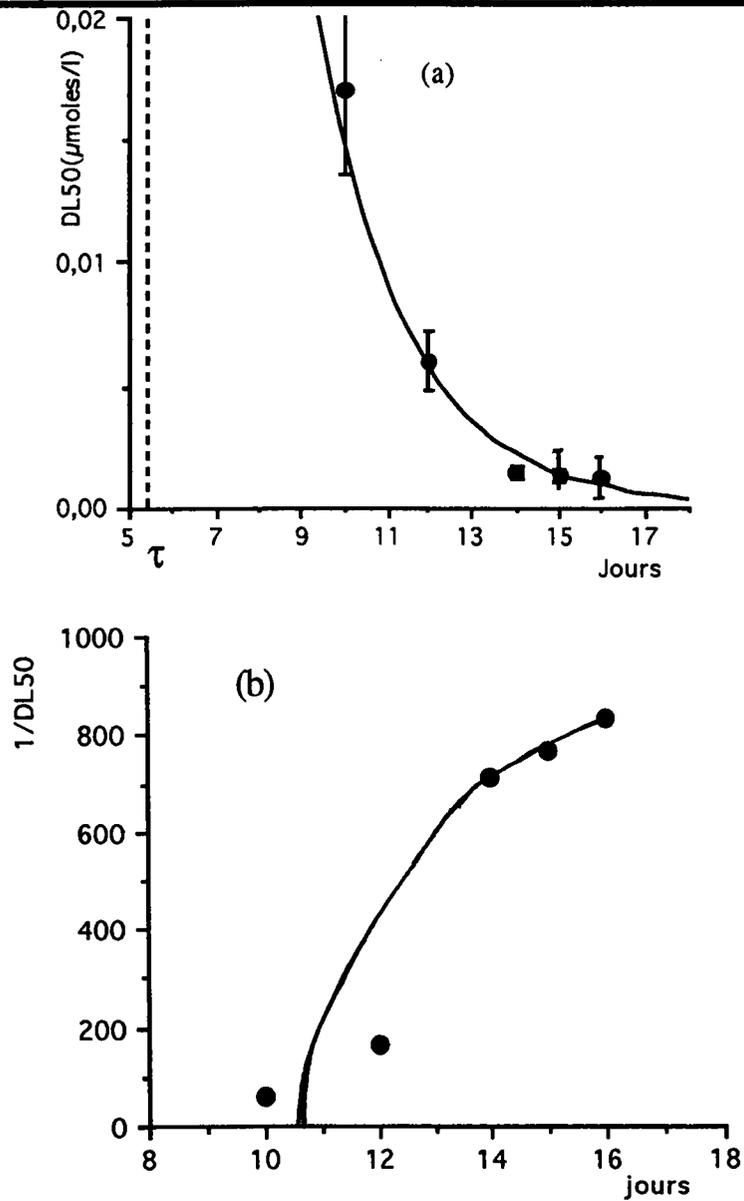


**Figure 27:** Variations du paramètre ( $\Delta_i - \Delta_o$ ) en fonction de la concentration de cyperméthrine, calculés à partir de la courbe de mortalité des abeilles.

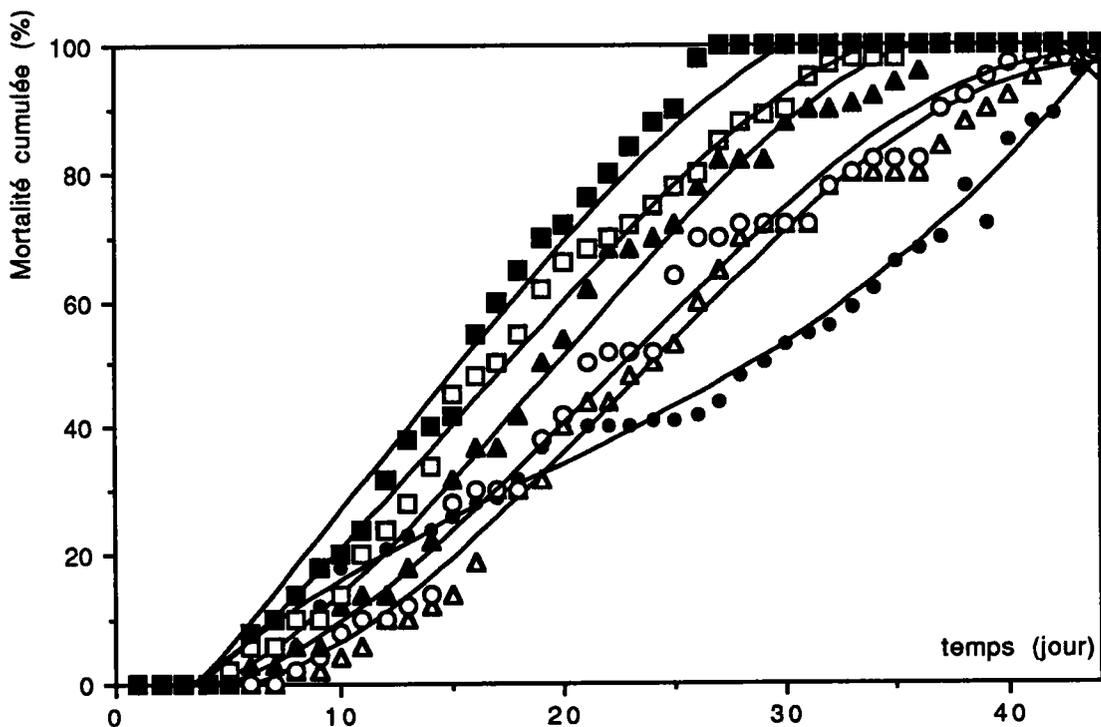
Les variations de la pente  $\Delta$  (Tab.8) représentant la vitesse de mortalité en fonction des doses sont illustrées par la Figure 27. La vitesse de mortalité suit une allure aisément interprétable, elle comporte une phase d'accélération, un point d'inflexion (peu marqué, correspondant au  $\Delta$  maximum) et enfin une phase de ralentissement. A partir de l'équation (4), sachant que  $\Delta_0 = 1,16\%/j$ ,  $\Delta_{\max} - \Delta_0 = 14,6\%/j$  d'où  $\Delta_{\max} = 15,8\%/j$  qui correspondant à la vitesse maximale de mortalité des abeilles en fonction des concentrations de la cyperméthrine. L'expression des mortalités en fonction de la concentration de la cyperméthrine, conduisant au calcul des DL50 ne peut être établie que pour des temps fixés à l'avance. Il est donc possible de calculer autant de valeurs de DL50 que de valeurs temps. Nos valeurs expérimentales ont permis de fixer les temps de calcul à 10 jours, 12 jours, 14 jours, 15 et 16 jours (Tab. 9, Fig. 28). La courbe de la Figure 28a présente une branche hyperbolique descendante. Quand la valeur ( $t$ ) tend vers l'infini la DL50 temps vers 0 et la mortalité vers 100%, y compris pour le lot témoin. La représentation semi-inverse (Fig. 28b) permet d'obtenir pour  $N=5$  couples de valeurs et un coefficient de corrélation ( $r=0,963$ ), la valeur d'un tend dit: temps limite ( $\tau$ ), qui traduit le délai nécessaire qu'il faut attendre avant de pouvoir calculer La DL50. Quand  $1/DL50$  temps vers 0 l'abscisse à l'origine donne  $\tau = 5,3$  jours, qui représente à son tour l'asymptote verticale de la figure 28a. la théorie montre que ce temps  $t_{\lim}$  correspond à la limite inférieure asymptotique du TL50 quand les doses tendent vers l'infini (BOUNIAS, 1989).

**Tableau 9:** Variations des DL50 du 10<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jours et les coefficients de corrélation (r), obtenus lors du calcul de la régression des Probits en fonction la cyperméthrine.

Jours	10	12	14	15	16
DL50 ( $\mu\text{moles/l}$ )	0,017	0,006	0,0014	0,0013	0,0012
coefficient de corrélation(r)	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97



**Figure 28:** Variations des DL50 ( $\mu\text{moles/l}$ ) de la cyperméthrine en nutrition continue en fonction du temps.(a): Relation directe, (b): Transformation en coordonnées semi-inverses.



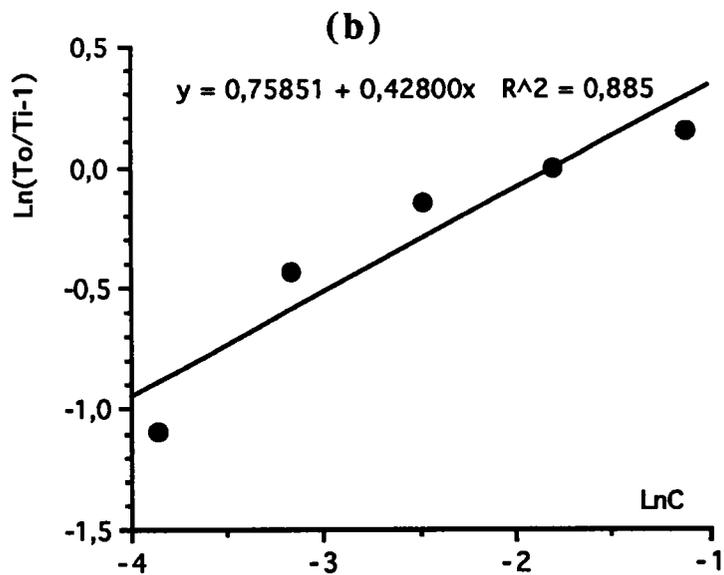
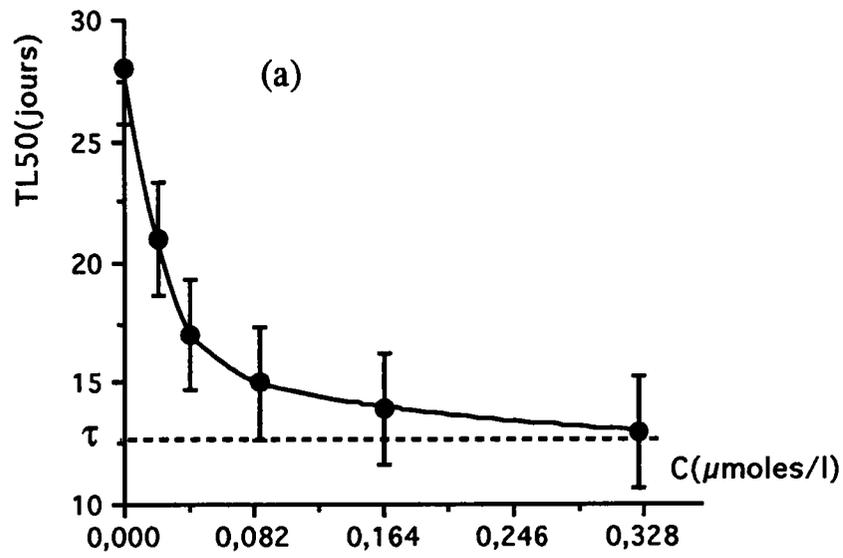
**Figure 29:** Courbes de mortalité cumulée des abeilles soumises à un nourrissage continu avec différentes concentrations de fénitrothion (●) témoin.: 0  $\mu\text{moles/l}$  ; ( $\Delta$ ) 0,021  $\mu\text{moles/l}$  ; (○) 0,042  $\mu\text{moles/l}$  ; ( $\blacktriangle$ ) 0,0484 $\mu\text{g/l}$  ; (□): 0,164  $\mu\text{moles/l}$  ; (■): 0,324  $\mu\text{moles/l}$ .

## 2. 1. 2-Le fénitrothion

La figure 29 représente les courbes de mortalité obtenues chez le lot témoin et les lots traités avec 5 doses différentes de fénitrothion. Sous ces conditions les abeilles témoins ont survécu jusqu'au 42ème jour, et celles recevant une forte dose (0,324  $\mu$ moles/l) de pesticide jusqu'au 27 ème jour. Les propriétés des courbes de mortalité peuvent être décrites par les paramètres de l'équation de Hill ( $nt$ ,  $\Delta$ ,  $TL50$ ,  $dT50$ ).

L'expression des  $TL50$  en fonction des concentrations du fénitrothion, présente l'allure d'une branche hyperbolique (Fig. 30a). La transformation en coordonnées semilogarithmique dans l'interprétation approchée où la courbe descendrait asymptotiquement vers la valeur limite 0 jour, à partir de la valeur mesurée chez le lot témoin. conduit à une droite (Fig. 30b) de pente  $nt= 0,428$  ;  $dT50=0,177$   $\mu$ moles/l de fénitrothion. La variation des vitesses de mortalité (Tab.10, Fig.31) par rapport aux lots témoins met en lumière des phénomènes que les autres méthodes ne permettent en aucun cas de déceler: ce sont les fluctuations dans l'homogénéité des mortalités  $\Delta_{max-\Delta 0}= 5,30$  %/J, d'où  $\Delta_{max}= 6,46$ %/j.

L'expression directe de la mortalité en fonction des concentrations du fénitrothion, conduit au calcul des  $DL50$  en fonction du temps. Nos données expérimentales, permettent de calculer des  $DL50$  pour le fénitrothion au temps 14 jours, 15 jours 16 jours, 17 jours, et 18 jours (Tab 11, Fig. 32a). La courbe présente une branche hyperbolique descendante. La présentation semi-inverse (Fig. 32b) et le calcul de régression obtenu à partir des données expérimentales, donnent, pour  $N=5$  couples de points:  $r=0,936$  et le temps  $\mathcal{T}=7,5$  jours qui constitue l'asymptote verticale à l'hyperbole de la courbe des  $DL50$  (Fig. 32a), en deçà duquel le calcul de la  $DL50$  est impossible.



**Figure 30:** Variation du temps correspondant à 50% de mortalité (TL50) en fonction des concentrations du fénitrothion.

To: TL50 du lot témoin

Ti: TL50 du lot traité à la dose i

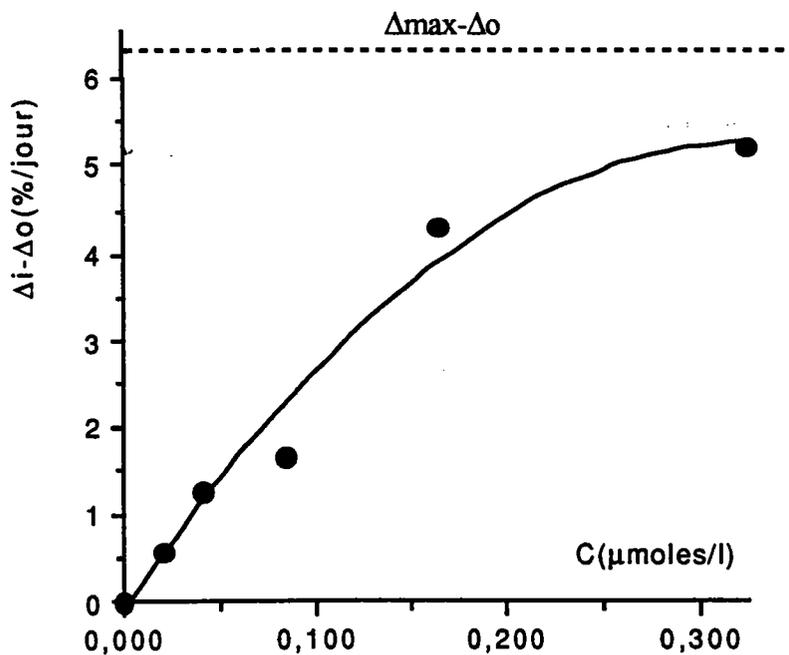
(a): relation directe

(b): relation bilogarithmique linéaire

**Tableau 10:** Paramètres algébriques dérivant de l'équation de Hill, appliquée à la courbe de mortalité des abeilles nourries par du sirop de saccharose à diverses concentrations du fénitrothion.

C ( $\mu\text{moles/l}$ )	N	TL50 ( $\sigma$ )	nt( $\sigma$ )	$\Delta$ (%/jour)
0	(6)	28 (1,2)	1,24 (0,15)	1,16
0,021	(6)	21 (2)	1,25 (0,25)	1,75
0,042	(6)	17 (1)	1,28 (0,36)	2,35
0,084	(6)	15 (1)	1,31 (0,35)	2,75
0,164	(6)	14 (1)	1,57 (0,2)	5,40
0,324	(6)	13 (2)	1,57 (0,08)	6,51

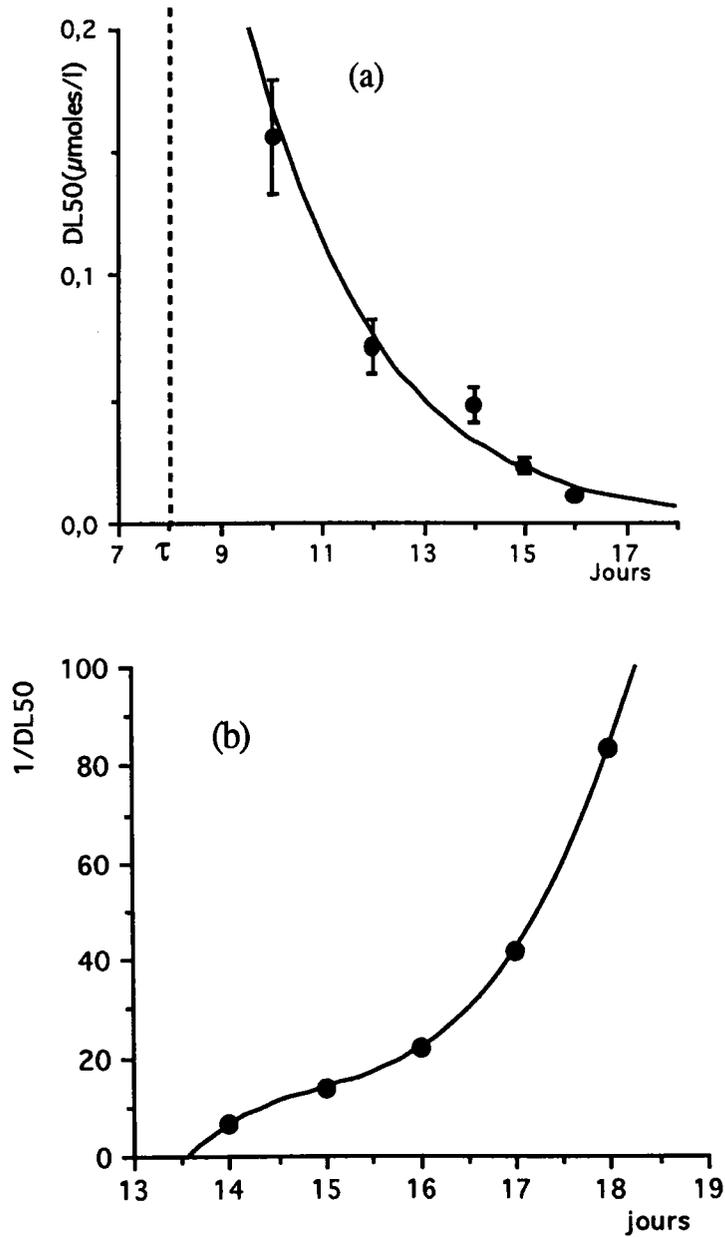
x: moyenne, ( $\sigma$ ): écart type, TL50: est égal au temps létal 50%, nt: coefficient de Hill,  $\Delta$ : vitesse de mortalité, N: nombre de répétitions.



**Figure 31:** Variation du paramètre  $\Delta_o - \Delta_i$  en fonction de la concentration du fénitrothion, chez les abeilles témoins et traitées au fénitrothion.

**Tableau 11:** Variations des DL50 du 14<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jours et les coefficients de corrélation  $s(r)$ , obtenus lors du calcul de la régression des Probits en fonction du fénitrothion.

Jours	14	15	16	17	18
DL50 ( $\mu\text{moles/l}$ )	0,156	0,072	0,048	0,024	0,012
coefficient de corrélation ( $r$ )	0,97	0,99	0,98	0,97	0,97



**Figure 32:** Variations des DL50 ( $\mu\text{moles/l}$ ) du fénitrothion en nutrition continue en fonction du temps. (a): Relation directe, (b): Transformation en coordonnées semi inverses.

## 2. 2-Discussion et conclusion

### 2. 2. 1-Intérêt de la modélisation

L'évaluation de la toxicité des pesticides sur les abeilles basée sur l'exemple de la cyperméthrine et du fénitrothion, montre que la DL50 est un paramètre qui présente beaucoup de contraintes (ZBINDEN & FLURY-ROVERSI, 1981 ; BOUNIAS, 1989 ; CHANTER & HEYWOOD, 1982). Le choix arbitraire d'une durée de temps fixé par l'opérateur, s'ajoutant à sa décroissance asymptotique en fonction du temps confère à la DL50 des écarts importants d'un laboratoire à l'autre. Les travaux effectués à ce sujet par plusieurs chercheurs prouvent la faiblesse de la DL50 comme paramètre de toxicité pour évaluer le risque encouru par les abeilles au contact des insecticides. C'est ainsi que pour le "Tetraéthyl-pyrophosphate" la DL50 prend des valeurs allant de 1 à 372, et de 1 à 953 pour l'ossuydurethon-méthyl (ASSOCIATE. COMITEE. ON SCIENTIFIC CRITERIA FOR ENVIRONMENTAL QUALITY, 1980). Ces différences proviennent sans doute des réponses obtenues sur l'abeille en fonction de l'âge, de la saison (KUNERT & CRAILSHEIM, 1988), de l'état physiologique et du stade de développement (BOUNIAS, 1980a, BOUNAIS *et al.*, 1985b). L'analyse basée sur le modèle mathématique de l'équation de Hill que nous avons esquissé, fait appel à la courbe de survie des abeilles et permet de calculer une série de paramètres descriptifs **non soumis à un choix arbitraire du facteur temps**. En outre, les calculs des probits ne prennent en considération ni la concentration 0 pour le lot témoin ni les limites supérieures des mortalités atteintes en fonction des doses.

1-Le TL50 déjà utilisé (MOLINENGO, 1979 ; CHRISTENSEN, 1984) constitue une fonction hyperbolique, mais en plus il inclut la valeur mesurée en l'absence de toxique, exprimé par le dT50: dose à laquelle le temps nécessaire pour observer la mort de 50% des individus est réduit de moitié par rapport au lot témoin.

2-Le paramètre  $n$  (coefficient de Hill) constitue un indice important de toxicité, il est d'autant plus élevé que le toxique accélère rapidement le phénomène de mortalité.

3-La valeur de la vitesse  $\Delta$ , est comme  $nt$ , une fonction croissante des doses dont la signification est basée sur toute la durée de vie de l'abeille, ce paramètre constitue une sorte de synthèse des deux précédents, Il est facultatif, mais présente l'intérêt de donner une relation d'allure voisine de celle des courbes classiques de mortalités/dose. cette méthode descriptive, serait d'autant plus utile que le produit est destiné à traiter les abeilles contre les maladies (NECTOUX, 1990), et permet une parfaite comparaison entre différents produits en se basant sur toute la durée de vie des abeilles. Il est certain qu'une colonie d'abeilles traitée par un médicament supportera mieux l'effet d'un produit qui entraîne une perte étalée dans le temps ( $\Delta$  faible) lui permettant d'avoir suffisamment de temps pour renouveler sa population, que dans le cas d'une brusque mortalité ( $\Delta$  forte). Elle permettra aussi de choisir une formulation dont les courbes de mortalités présenteront un  $nt$  et  $\Delta$  moins élevés. Enfin elle permet aussi de classer les insecticides selon leur toxicité chronique. Si nous appliquons cette méthode à la cyperméthrine et au fénitrothion, nous obtenons les résultats suivants (Tab. 12).

**Tableau 12:** Récapitulatif des nouveaux paramètres issus de l'équation de Hill, les valeurs moyennes ( $\bar{x}$ ) et les écart types ( $s$ ) ont été calculés pour  $N=5$  déterminations.

Paramètres	$nt$ (N=4)	$dT50 \pm \sigma$ ( $\mu\text{mole/l}$ )	$\tau$ (jours) (N=4)	$\Delta_{\text{max}} (\%/j) \pm \sigma$ (N= 4)
Cyperméthrine	$0,545 \pm 0,05$	$0,028 \pm 0,015$	$5,3 \pm 2,0$	$15,8 \pm 0,8$
fénitrothion	$0,428 \pm 0,31$	$0,072 \pm 0,020$	$7,5 \pm 1,4$	$6,3 \pm 1,4$

Ces différents paramètres permettent non seulement d'évaluer la toxicité des produits, mais aussi, de les classer les uns par rapport aux autres selon leur toxicité relative.

$(n_t, \Delta max)$  cyperméthrine >  $(n_t, \Delta max)$  fénitrothion.

$dt50$  (cyperméthrine) <  $dt50$  (fénitrothion)

L'abeille étant un animal social, plusieurs facteurs sont susceptibles de modifier le comportement des abeilles en captivité.

## 2. 2. 2-Limites des différentes techniques utilisées

### -Limites intrinsèque à l'abeille

**a-L'effet de groupe:** Plusieurs auteurs se sont occupés de la survie des abeilles isolées et groupées. CHAUVIN (1960) et SITBON (1967) concluent que l'isolement des abeilles agit significativement sur leur durée de vie, qui diminue par rapport à celle de leurs congénères groupées. Les abeilles isolées depuis la naissance meurent plus vite que celles groupées par dix (ARNOLD, 1970). Plus tard, on a pu montrer aussi que l'absence de congénères provoque une diminution dans la prise alimentaire, et une augmentation de mortalité, surtout pendant les premiers jours de leur sorties des alvéoles où les échanges alimentaires sont à leur maximum entre les nourrices et les abeilles naissantes (COSTA-LEONARDO & CRUS-LANDIN, 1983). A ce sujet COURTOIS & LECOMTE (1961) affirment que le prolongement de la vie des abeilles sous l'effet de groupe, serait du à une phéromone à base d'acides azélaïque et pimélique (CHAUVIN, 1960) trouvés dans les extraits d'abeilles ouvrières. Cette hormone agirait en réduisant les échanges gazeux et en diminuant la consommation des réserves lipidiques due au stress, dont la confirmation au niveau des effets biochimiques a été apportée par JURAND *et al.*(1989).

**b-L'effet reine:** ROGER & PAIN (1965) ; ROGER (1974), sont parvenus à démontrer l'influence de la reine sur les abeilles. Elle agirait en diminuant la mortalité des abeilles en groupe. La présence de la reine diminue l'excitation des abeilles accompagnatrices et augmenterait significativement leur prise alimentaire en cagette (ROGER, 1974 ; HAZAN *et al.*, 1989) sous l'effet de la phéromone d'attraction royale (BARBIER & LEDERER, 1960). Par contre l'absence de la reine dans une population d'abeilles entraîne une forte mortalité, une diminution de la défense de la ruche et une moindre récolte du pollen. Enfin les colonies sont sujettes à de forts pillages (DELAPLANE & HARBO, 1987).

**c-l'alimentation:** Il est vrai que le saccharose est l'aliment le plus adapté pour les abeilles en cagette (BACHMAN & GORDON, 1977), mais cela nous éloigne des conditions naturelles, quand on sait que les abeilles se nourrissent principalement de miel et de pollen.

**d-L'origine des abeilles:** La prise alimentaire des abeilles et leur longévité varient selon la colonie d'origine: cela serait dû à la variabilité génétique qui existe entre les individus des différentes colonies FREE (1980) ; WINSTON & KATZ (1981) ; CHARLES (1985) ; KULINCEVIC & ROTHENBULER (1989).

**e-Les variations saisonnières de la physiologie des abeilles:** Les abeilles d'été et les abeilles d'hiver ne présentent pas la même physiologie (BOUNIAS, 1980a ; BOUNIAS *et al.*, 1985a et b ; CRAILSHEIM, 1986 ; KUNERT & CRAILSCHEIM, 1988 ; EISCHEN *et al.*, 1982).

**f-Activité excrétrice des abeilles:** Dans les conditions normales, les abeilles effectuent des vols de nettoyage au cours desquels s'effectue l'excrétion ; en captivité nous avons remarqué que les abeilles retiennent très nettement leur excréments. De ce fait, leur alimentation baisse et leur abdomen marque un gonflement dû à la rétention des

déchets. Nous assistons donc à une auto-intoxication qui pourrait biaiser les tests de toxicité chroniques effectués sur les abeilles en captivité.

#### **-Limites liées aux conditions expérimentales**

**Les tests en laboratoire** ne permettent pas de tenir compte de la circulation des produits dans le végétal et dans le sol, qui peut conduire soit à des dégradations plus ou moins rapides, soit à une accumulation jusqu'à des concentrations dangereuses. Toutes ces observations nous amènent à prendre des précautions, quant aux extrapolations que nous risquerions de faire, lorsque nous passons du stade laboratoire où l'élevage des abeilles en captivité pose toujours des problèmes (DOUAULT, 1989), au stade application sur le terrain. L'abeille est un animal social qui devrait être considéré en tant que groupe, où des interactions entre les abeilles et la reine d'une part et les abeilles entre elles, d'autres part se passent tout au long de la vie d'une ruche. Déterminer la toxicité à long terme à partir d'un effectif d'abeille très réduit, hors des conditions de vie normales est une démarche trop risquée. Pendant nos recherches nous nous sommes heurtés au problème de la faible homogénéité qui existe au sein d'une même ruche. Cette variabilité proviendrait en grande partie de la reine, qui est fécondée par plusieurs mâles durant son vol nuptial. Autrement dit la réserve spermatique est très hétérogène, chaque mâle apporte un potentiel génétique différent, d'autant plus que les mâles d'autres colonies avoisinantes peuvent féconder une reine qui n'est pas la leur. L'homogénéité des lots fondée sur l'appartenance à une même colonie reste largement critiquable pour les tests au laboratoire. L'une des solutions pour atténuer ce problème d'homogénéité, serait de se constituer un potentiel de ruches où toutes les reines des colonies qui seraient exclusivement destinées aux tests d'écotoxicité, soient issues d'une insémination artificielle, où chaque reine serait fécondée par un mâle et un seul.

A ce manque d'homogénéité, l'absence de la reine dans les cagettes expérimentales

pose un autre problème qui a son importance, que nous étudierons plus en détail plus loin. En réalité le comportement de l'abeille ne peut être dissociée de celui de la reine. La prise alimentaire, la longévité, le stress, sont des paramètres parmi beaucoup d'autres qui dépendent directement de la phéromone royale. Il serait donc très intéressant de voir l'effet de l'introduction d'une hormone de synthèse sur la toxicité d'un produit en cagettes. L'analyse toxicologique basée sur la méthode de modélisation, qui prend en compte les pourcentages de mortalité à long terme en fonction des doses administrées, se déroule sur toute la durée de vie des abeilles. Elle permet de déterminer de nouveaux paramètres toxicologiques qui permettent d'évaluer, de comparer et de classer éventuellement les produits selon leur toxicité respectives. Cette classification aura l'avantage d'être faite sur toute la durée de vie de l'abeille, en prenant en considération dans le calcul, le comportement du lot témoin, correspond à une concentration nulle du toxique. Du fait de la négligence de ce facteur, la DL50 calculée à partir des probits reste très tributaire du facteur temps (DL50, 24h). Cette méthode de modélisation peut être aussi appliquée au calcul des DL50 (BOUNIAS, 1989) dans le cas des intoxication aiguës par la représentation double logarithmique  $\ln(M/100-M) = f(\ln(D-D_0))$ . A titre indicatif les DL50 calculées par cette méthode (Tab. 13) ne présente aucune différence significative avec celles calculées par les probits, donc c'est une alternative valable aux probits (Tab. 13).

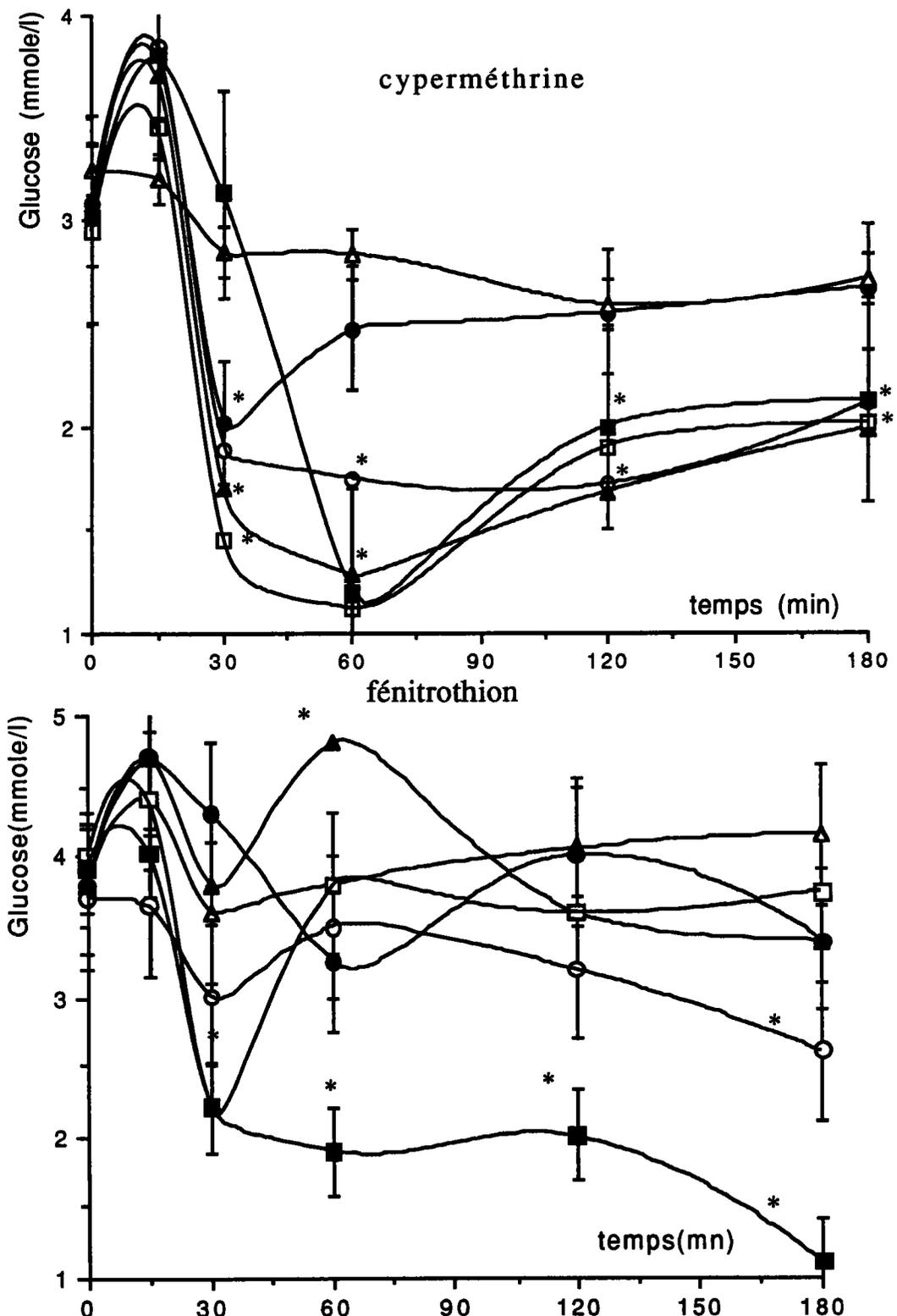
**Tableau 13:** DL50, calculées par la méthode dérivée de l'équation de Hill. Les moyennes  $\pm$  les écart types ont été calculées pour N= 6 déterminations.

	Cyperméthrine	Fénitrothion
DL50/24h (nmoles/abeille)	0,37 $\pm$ 0,021 (N=6)	1,02 $\pm$ 0,10 (N=6)

En pratique, cette méthode trouve sa limite, dans la durée de vie des animaux de laboratoire: Il serait proportionnellement plus long (et éventuellement plus coûteux) de l'appliquer à des individus dont la durée de vie pourrait durer des années. Il est certes concevable que suivre la toxicité sur des animaux qui ont une durée de vie de 4 ou 5 ans, ne paraisse guère pratique en toxicologie appliquée, surtout si les résultats doivent être rendus rapidement: dans ces conditions la DL50/24h par les probits reste plus facilement applicable, en contrepartie d'une information de valeur restreinte.

En conclusion la détermination de la toxicité aiguë apporte une réponse rapide mais peu précise sur la toxicité intrinsèque d'un insecticide vis à vis de l'abeille, cette réponse permet de classer les insecticides dans une échelle de toxicité relative. elle permet aussi d'évaluer la toxicité théorique potentielle aux concentrations préconisées en agriculture. La comparaison avec la situation réelle sur le terrain doit se faire avec beaucoup de réserve. Des intoxications aiguës avec apparition d'une forte mortalité immédiate, s'observent sur le terrain, dues souvent à des erreurs d'application, aspersion sur des adventices en fleurs de produits reconnus toxiques pour les abeilles....). Mais qu'arrive t-il quand les abeilles sont en contact avec des doses infimes d'insecticides ? Est ce que le métabolisme est perturbé bien qu'on n'observe pas de mortalité à court terme ? Est ce qu'à long terme ces doses sublétales ont des conséquences sur l'évolution générale des colonies ? C'est ce que nous essayerons de clarifier dans les chapitres suivants.

**B-ACTION DES DOSES SUBLETALES DE LA CYPERMETHRINE ET DU FENITROTHION SUR LE METABOLISME  
DE L'ABEILLE**



**Figure 33:** Variation du taux moyen du glucose dans l'hémolymphe (mmole/l) chez les lots traités à la cyperméthrine et au fénitrothion: les témoins( $\Delta$ ) ; ( $\bullet$ ) 0,01 nmole/abeille ; ( $\circ$ ) 0,02 nmole/abeille ; ( $\blacktriangle$ ) 0,04 nmole/abeille ; ( $\square$ ) 0,08 nmole/abeille ; ( $\blacksquare$ ) 0,1nmole/abeille. les barres verticales représentent les écart-types pour N=6 déterminations. Pour chaque dose et chaque temps 25 abelles sont sacrifiées. Astérisque (\*) Indiquent les différences significatives par rapport aux témoins  $P < 0,05$ .

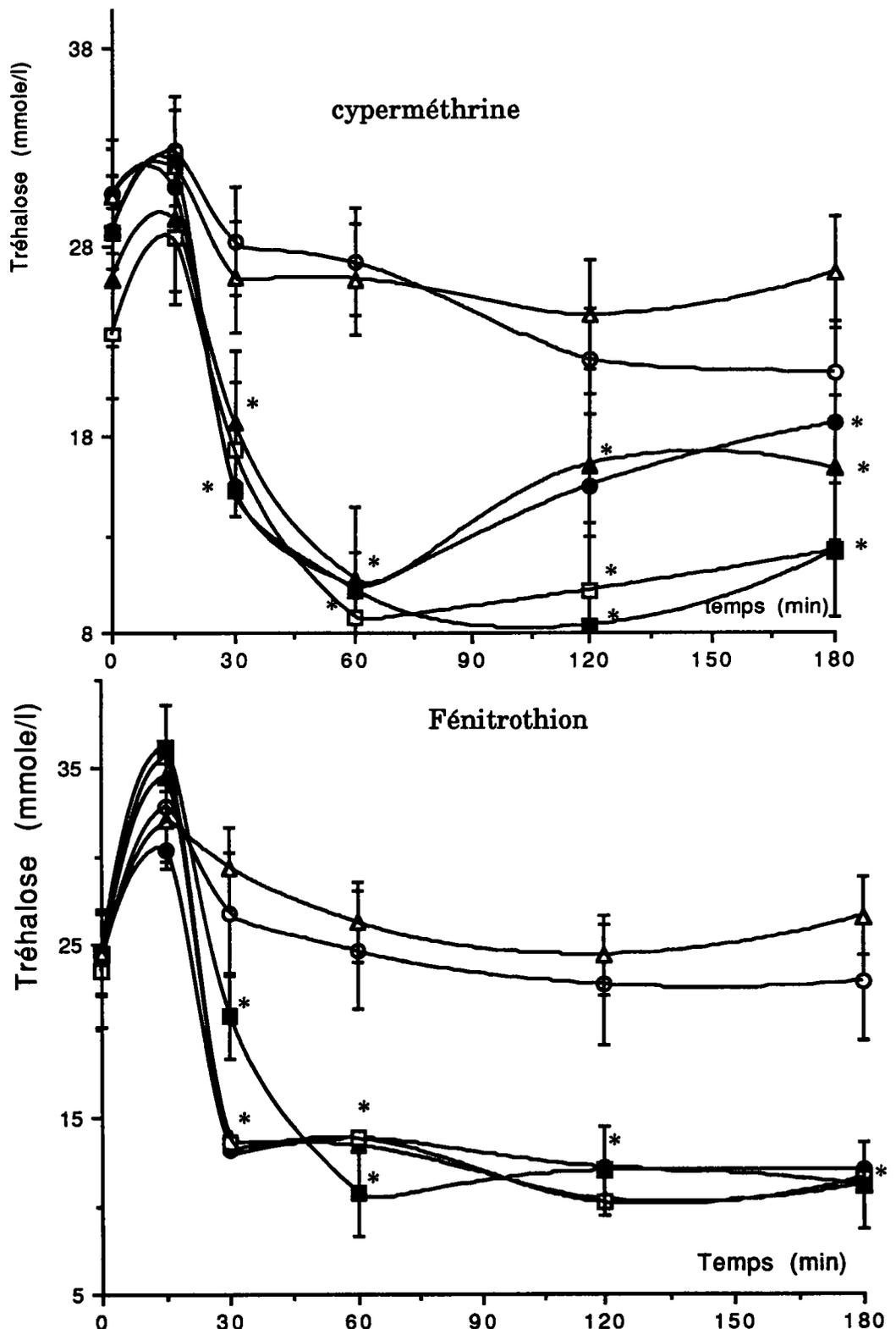
## **1-Effet de la cyperméthrine et du fénitrothion sur le métabolisme glucidique de l'abeille**

Les substances ingérées par l'abeille lors de son nourrissage transitent par l'appareil digestif et aboutissent dans l'hémolymphe. C'est dans ce milieu que les insecticides ont été injectés à des doses sublétales, afin d'évaluer leur impact sur le métabolisme glucidique, enzymatique et nerveux. On étudiera d'abord l'action de la cyperméthrine et du fénitrothion sur le métabolisme glucidique et ensuite sur l'activité cholinestérasique reconnue comme cible des organophosphorés (IBRAHIM *et al.*, 1974 ; KASTURI & CHANDRASHEKAR, 1977 ; BRATTSTEN, 1990) et enfin l'action des deux insecticides sur l'ATPase ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) dépendante. Les effets des pyréthrinoïdes sur les échanges neurophysiologiques et plus particulièrement sur la perméabilité des canaux à sodium ont effectivement été confirmés par de nombreux auteurs: (BURT & GOODCHILD, 1971 ; CAMOUGIS & DAVIS, 1971 ; CHENG & CUTKOMP, 1972 ; JACQUES, 1980).

### **1. 1-Résultats**

#### **1. 1. 1-la glycémie**

Les variations du taux du glucose dans l'hémolymphe d'abeille, en fonction de différentes doses de cyperméthrine et de fénitrothion sont résumées dans la Fig. 33. Le taux du glucose sous l'effet de la cyperméthrine injectée dans les muscles thoraciques montre un pic vers 15 minutes aussi bien pour toutes les doses que pour le lot témoin. Puis à 30 minutes, il s'est dégagé une nette hypoglycémie significativement différente par rapport au témoin ( $P < 0,05$ ) aux doses: 0,02 ; 0,04 ; 0,08 et 0,1 nmole/abeille, et dure jusqu'à 60 minutes après l'injection. Ensuite, il apparaît une phase de récupération dans laquelle l'abeille tend à rétablir le glucose à son taux normal. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe témoin et celui ayant reçu 0,1 nmole/abeille de cyperméthrine. Le même phénomène a été observé sous l'effet du fénitrothion, marqué par quelques différences par rapport aux courbes obtenues quand il s'agit de la cyperméthrine. En effet l'hypoglycémie est moins spectaculaire, seulement la dose de



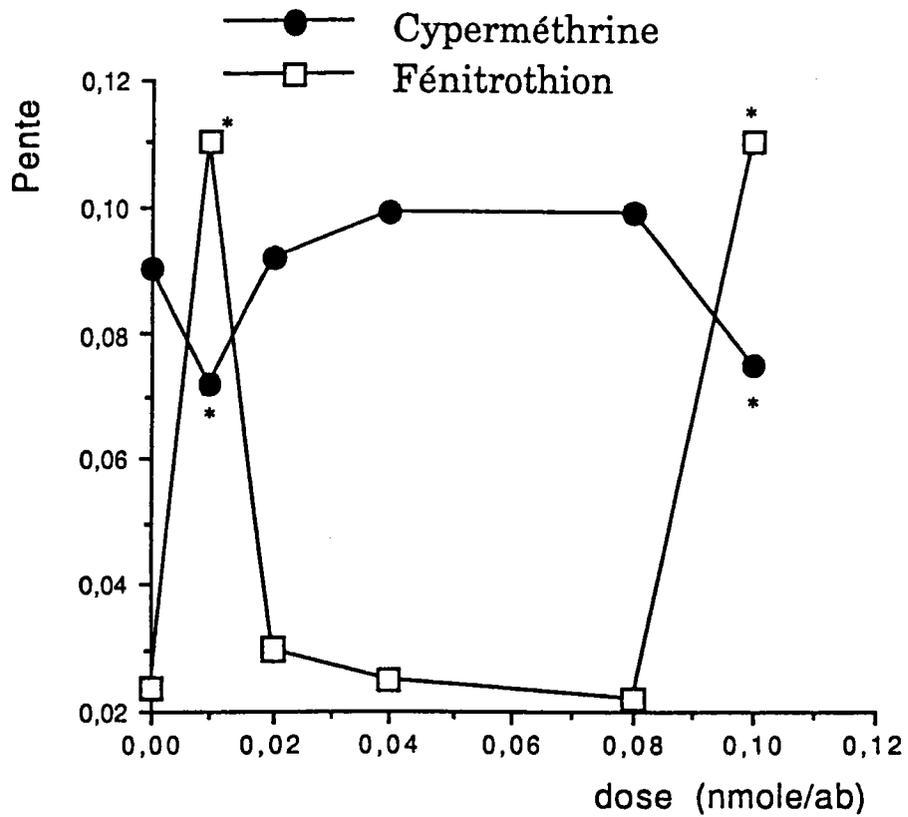
**Figure 34:** Variation du taux moyen du tréhalose en (mmole/l) chez les lots traités à la cyperméthrine et au fénitrothion: chez les abeilles témoins ( $\Delta$ );( $\circ$ ) 0,01 nmole/abeille ; ( $\bullet$ ) 0,02 nmole/abeille ; ( $\blacktriangle$ ) 0,04 nmole/abeille ; ( $\square$ ) 0,08 nmole/abeille ; ( $\blacksquare$ ) 0,1 nmole/abeille. les barres verticales représentent les écart-types pour N=6 déterminations.. Pour chaque dose et chaque temps 25 abeilles sont sacrifiées. Astérisques (\*) indiquent les différences significatives  $P < 0,05$ .

0,1 nmole/abeille de fénitrothion a provoqué une hypoglycémie significative ( $P < 0,05$ ). Aucune différence n'a été observée entre les autres doses (0,02 ; 0,04 ; 0,08 nmole/abeille) et le lot témoin jusqu'à 120 minutes, à l'exception de 0,04 nmole/abeille au temps  $t=60$  minutes, où l'on a observé une hyperglycémie ( $P < 0,05$ ) qui ne tarde pas à se rétablir quelques minutes plus tard. Au bout de 180 minutes la dose de 0,02 nmole/abeille induit aussi une hypoglycémie tardive. Enfin 0,1 nmole/abeille de fénitrothion provoque plus de dommages à l'abeille que la même dose de cyperméthrine: en fait, aucune phase de récupération n'a été notée à cette dose quand il s'agit du fénitrothion .

**1. 1. 2-le tréhalose:** Concernant le tréhalose après les injections de cyperméthrine (Fig. 34) l'allure des courbes de variations du taux de tréhalose sont semblables à celles du glucose, mais la phase de récupération paraît être plus longue aux fortes doses (0,08 et 0,1 nmole/abeille de cyperméthrine) et aucune différence n'a été observée entre 0,01 nmole/abeille et le témoin. A 120 minutes les concentrations du tréhalose atteintes sous l'effet de la cyperméthrine aux doses 0,08 et 0,1 nmole/abeille sont significativement ( $P < 0,05$ ) inférieures à celles induites par 0,04 et 0,02 nmole/abeille. L'hypotréalosémie provoquée par le fénitrothion, montre aussi quelques points différents par rapport à celle obtenue sous l'effet de la cyperméthrine. En effet, entre 30 minutes et 180 minutes (Fig. 34), la phase de rétablissement du tréhalose n'est pas aussi marquée qu'en présence de cyperméthrine et reste largement inférieure à la normale. Pour toutes les doses de fénitrothion, la récupération reste très faible, voire absente. Les paramètres de régression linéaire calculés entre les variations du glucose et du tréhalose pour les deux insecticides montrent des coefficients de corrélation de significations très variables, ce qui de manière dé耦plée laisse supposer que, dans quelques cas, les variations du glucose et du tréhalose se font indépendamment l'une de l'autre (Tab. 14). La figure 35 montre nettement une opposition des effets respectifs des deux pesticides.

**Tableau 14:** Relation entre le taux du Tréhalose et du Glucose des abelles témoins et traitées. Les paramètres des régressions linéaires sont donnés pour (N) paires de données pour des doses allant de 0 à 0,1 nmole/abeille. r: coefficient de corrélation, P(r): paramètres probabilité, "  $b \pm S_b$  " est la pente  $\pm$  écart type..  $Y = a + (b \pm S_b)X$ .

Doses (nmole/abeille)		0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,1
Paramètres induits par la Cyperméthrine	(N) r	(5)0.799	(5)0.538	(5)0.850	(5)0.687	(5)0.748	(5)0.750
	P(r)	<0.01	<0.30	<0.001	<0.10	<0.02	<0.02
	$b \pm S_b$	0.09 $\pm$ 0.031	0.072 $\pm$ 0.021	0.092 $\pm$ 0.015	0.099 $\pm$ 0.042	0.099 $\pm$ 0.028	0.075 $\pm$ 0.015
	a	0.37	0.76	0.51	0.49	0.49	1.22
paramètres induits par le Fénitrothion	(N) r	(5)0.780	(5)0.777	(5)0.710	(5)0.538	(5)0.485	(5)0.880
	P(r)	<0.02	<0.02	<0.05	<0.30		<0.001
	$b \pm S_b$	0.024 $\pm$ 0.011	0.11 $\pm$ 0.041	0.30 $\pm$ 0.039	0.025 $\pm$ 0.019	0.022 $\pm$ 0.008	0.11 $\pm$ 0.036
	a	3.3	1.08	2.61	3.65	3.03	0.50



**Figure 35:** Variation des pentes de régressions de la tréhalosémie et de la glucosémie en fonction de différentes doses de cyperméthrine et de fénitrothion. Astérisques (\*) indiquent les différences significatives ( $P < 0.05$ ) en comparaison avec le lot témoin.

## 1. 2-DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ces analyses comparatives entre les lots témoins et les lots traités d'une part, et entre les deux lots traités d'autre part, nous permettent de dégager les effets des deux insecticides sur la biochimie de l'abeille et par la même occasion, d'analyser comparativement l'effet des deux classes d'insecticides, pyréthrinoïdes et organophosphorés, représentés ici par la cyperméthrine et le fénitrothion. L'application de doses sublétales de ces deux produits pendant 3 heures, se traduit par une hypoglycémie et une hypotréhalosémie, 30 minutes après l'injection des insecticides. Seule la dose la plus élevée 0,1 nmole/abeille de fénitrothion provoque une hypoglycémie significative alors que pour la cyperméthrine l'hypoglycémie et l'hypotréhalosémie sont induites par toutes les doses sauf 0,01 nmole/abeille. Le control hormonal du métabolisme lipidique et glucidique de l'abeille (BOUNIAS & PACHECO, 1979a et 1979b ; BOUNIAS, 1985, 1986, 1987) ainsi que l'action des insecticides sur ces mêmes métabolismes (ORCHARD, 1980 ; BOUNIAS *et al.*, 1985a ; M'DIAYE & BOUNIAS, 1993) ont fait l'objet de plusieurs études. En ce qui concerne le mode d'action biochimique des insecticides, l'interaction de certaines molécules avec les cellules neurosécrétrices responsables de la régulation de la glycémie, il semble y avoir une relation entre les sécrétions neurohormonales et l'induction de cette hypoglycémie (ORCHARD, 1980 ; BOUNIAS, 1985). BOUNIAS *et al* (1985a) et M'DIAYE & BOUNIAS (1993) ont noté que l'action des pyréthrinoïdes administrés à doses sublétales était similaire à l'action adrénérgique de l'AMPC. Des travaux sur la bioresméthrine "un pyréthrinoïde de synthèse" on conduit à établir une liaison entre les intoxications aux insecticides et l'hyperactivité du système nerveux, ce qui induit des sécrétions de vésicules qui joueraient un rôle dans la régulation neurohormonales du métabolisme (SINGH & ORCHARD, 1982, 1983). Les pics initiaux observés dans le taux du glucose et du tréhalose dans l'hémolymphe d'abeille aussi bien pour les lots traités et le lot témoin, sont dûs à un choc aminérgique, induit par le stress suite à l'injection (BOUNIAS *et al*, 1985a & 1985 b

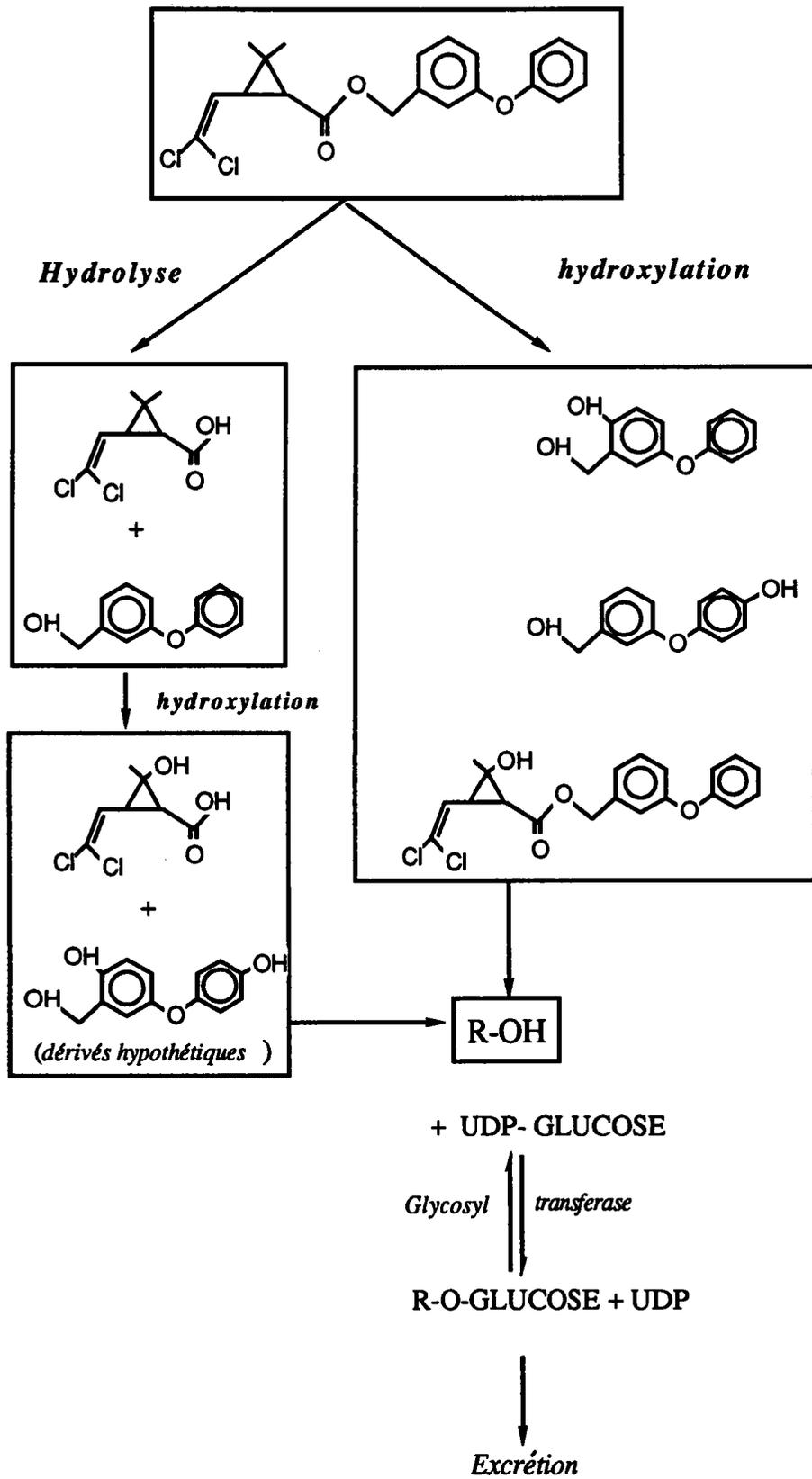
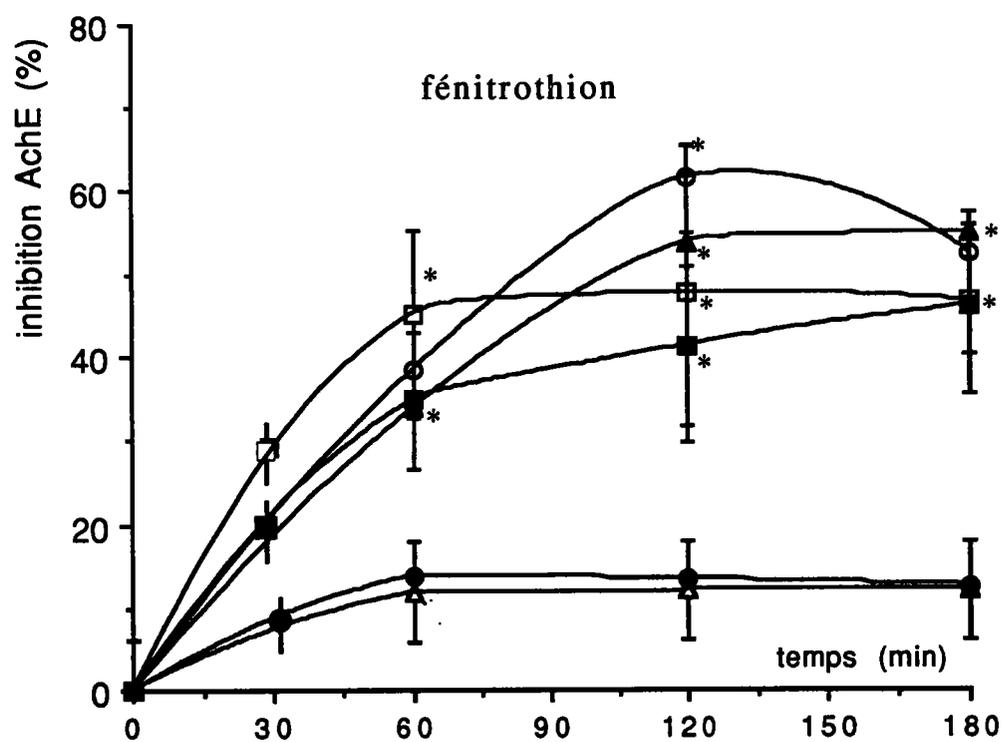
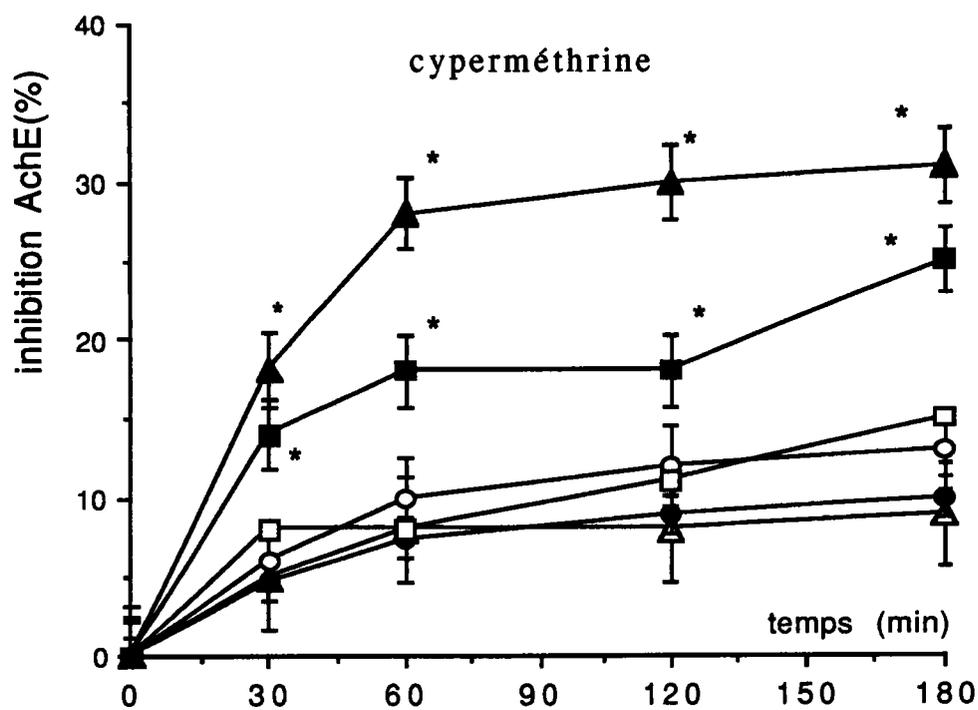


Figure 36: Métabolisme de la perméthrine adapté à partir de (MYAMOTO & SATO, 1968)

(BOUNIAS *et al.*, 1985a, 1985b ; CASCINO *et al.*, 1989 ; DOWNER, 1982). La différence d'effets entre la cyperméthrine et le fénitrothion, sur les glucides hémolympatiques se situent à deux niveaux.

**a-L'effet dose:** seule la plus haute dose 0,1 nmole/abeille et la plus basse (0,01 nmole/abeille) à 180 min de fénitrothion ont pu provoquer de sérieux dommages, alors que la cyperméthrine induit de graves conséquences, même à très faibles doses (0,02 ; 0,04 et 0,08 nmole/abeille).

**b-La phase de récupération:** qui intervient dans le rétablissement du taux du glucose est beaucoup plus longue, quand il s'agit du fénitrothion (0,01 et 0,1 nmole/abeille) que lorsqu'il s'agit de la cyperméthrine pour les fortes doses. A l'opposé les abeilles paraissent mieux rétablir leur taux de tréhalose après action de la cyperméthrine qu'après celle du fénitrothion. Toutes ces observations à propos de l'effet de la cyperméthrine et du fénitrothion sur le métabolisme glucidique, laissent supposer que les mécanismes mis en jeu au cours du processus d'intoxication par ces deux insecticides ne sont pas les mêmes. L'hypoglycémie induite par la cyperméthrine et le fénitrothion à des doses sublétales, peut entraîner de graves conséquences sur l'évolution de l'abeille, puisque l'un des mécanismes de détoxification des insecticides (Fig. 36), montre le rôle que joue le glucose dans le transport des insecticides par des hydroxylations successives avant leur excrétion (MYAMOTO & SATO, 1968). En plus BOUNIAS & MORGAN (1987) démontrent la corrélation significative entre la productivité des ruches et le taux de glucose dans les abeilles naissantes. Enfin, les abeilles butineuses doivent effectuer de longues distances entre les ruches et les champs mellifères, souvent chargées de nectar et de pollen: si elles viennent à manquer d'énergie, elles se trouveraient sans aucune possibilité de retour à la ruche et une disparition des colonies pourrait survenir au terme de ces perturbations.



**Figure 37:** Activité cholinestérasique chez l'abeille en fonction de doses croissantes de cyperméthrine et de fénitrothion: (▲) témoin, (●) 0,01 nmole/abeille, (○) 0,02 nmole/abeille, (□) 0,04 nmole/abeille, (■):0,08 nmole/abeille, (▲) 0,1 nmole/abeille. Les barres verticales représentent les écart types pour N= 5 déterminations pour 25 abeilles par temps et par dose. Les Astérisques (\*) indiquent les différences significatives P<0,05).

## **2-L'effet comparé de la cyperméthrine et du fénitrothion sur l'activité cholinestérasique (AChE) et ATPasique.**

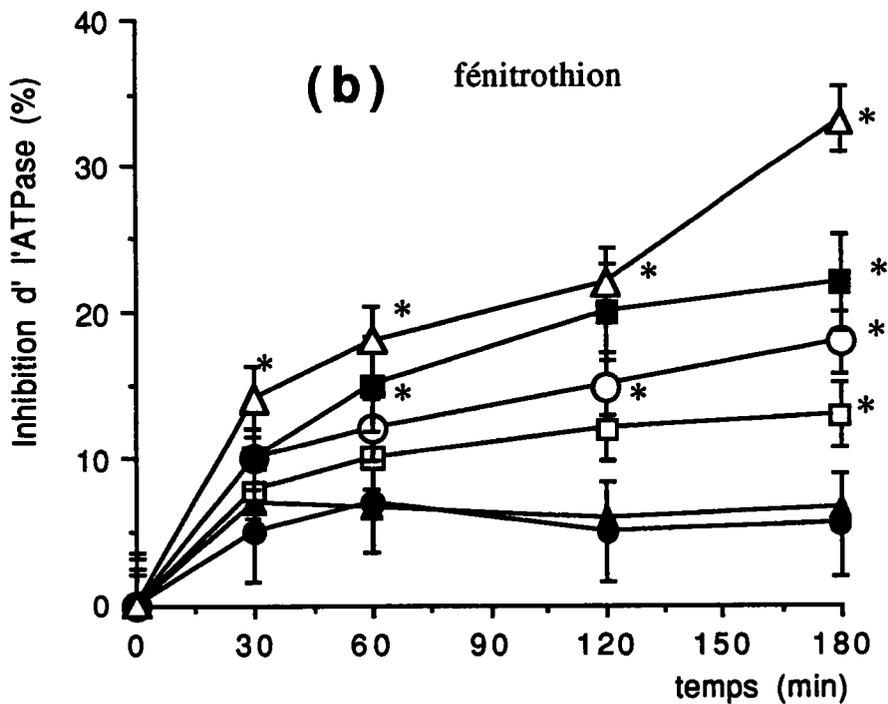
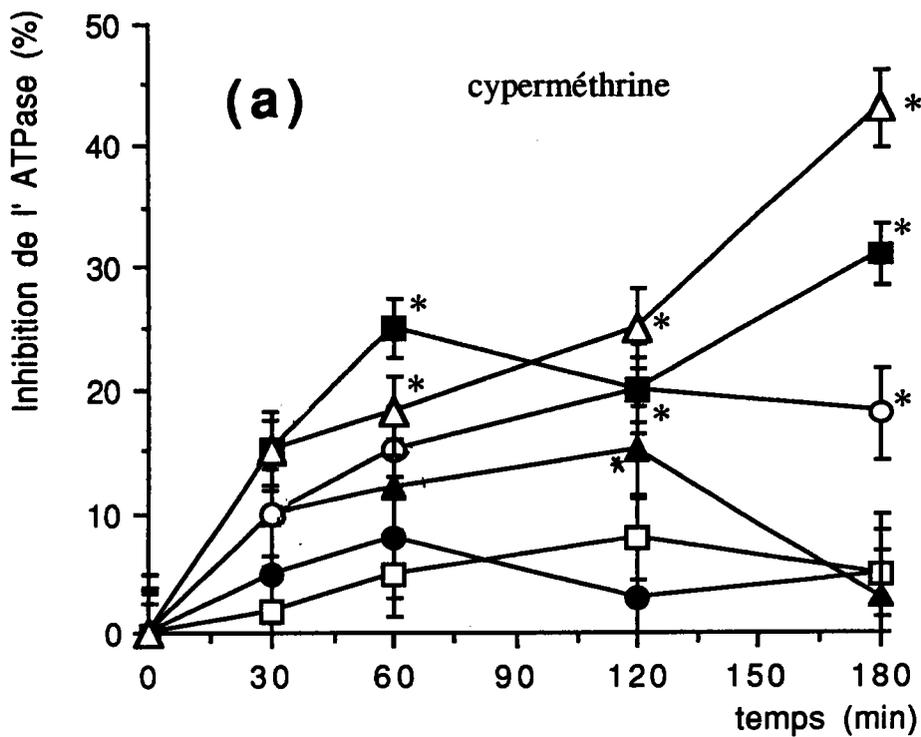
### **2. 1-Résultats**

#### **2. 1. 1-Effet des deux insecticides sur l'activité cholinestérasique**

L'action de la cyperméthrine à des doses sublétales sur la transmission nerveuse dosée par l'intermédiaire de l'activité cholinestérasique est représentée sur la Figure 37. Les courbes montrent l'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la dose d'insecticide administrée aux abeilles. En partant de l'origine elles décrivent deux phases principales:

**a-Une phase ascendante:** les pourcentage d'inhibition décrivent des courbes de fortes pentes, située entre 0 minutes et 60 minutes pour les dose 0,08 et 0,1 nmole/abeille. Les courbes des autres doses ne présentent aucune différence par rapport au lot témoin.

**b-Plateau de saturation:** A partir de 60 minutes et jusqu'à 180 minutes les pentes s'affaiblissent et les courbes tendent à décrire un plateau jusqu'à la fin de l'essai. Durant ces deux phases le pourcentage d'inhibition reste significativement plus élevé par rapport au témoin mais sans dépasser les 31 % pour la plus forte dose de cyperméthrine. Par contre aucune différence significative n'a été observée entre le lot témoin et les doses de 0,01 ; 0,02 et 0,04 nmole/abeille. Les différences significatives entre les lots traités (0,1 nmole/abeille) et les témoins apparaissent à partir de 30 minutes ( $P < 0,05$ ). C'est avec le fénitrothion qu'on observe le pourcentage d'inhibition le plus élevé (61,71%) à 0,02 nmole/abeille, 120 minutes après injection. Toutes les doses de fénitrothion sauf 0,01 nmole/abeille provoquent une inhibition significative ( $P < 0,05$ ) du % d'inhibition sans relation dose effet à partir de 0,02 nmole/abeille entre les divers % d'inhibition dus aux différentes doses de fénitrothion, comparés deux à deux. Au bout de 120 minutes, les abeilles sont totalement immobiles et présentent des tremblements dans tout le corps, excepté pour les lots témoins et celui ayant reçu 0,01 nmole de fénitrothion par abeille.



**Figure 38:** Cinétique d'inhibition de (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATPase chez l'abeille en fonction des doses croissantes de cyperméthrine et de fénitrothion. (●) témoins, (▲) 0,01 nmole/abeille, (□) 0,02 nmole/abeille, (○) 0,04 nmole/abeille, (■) 0,08 nmole/abeille, (△) 0,1 nmole/abeille. Les barres verticales représentent les écart-types calculés pour N=6 déterminations. Chaque point correspond une moyenne calculée sur 25 abeilles. Les astérisques(\*) Indiquent les différences significatives par rapport au lot témoin (P<0,05).

## 2. 1. 2-Effets sur l'activité ATPasique

les courbes de la figure 38 représentent l'évolution de l'inhibition de l'activité ATP asique en fonction de différentes doses de cyperméthrine et de fénitrothion durant 3 heures. Les abeilles ayant reçu de la cyperméthrine, montrent une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) du pourcentage d'inhibition de l'activité ATPasique, par rapport au lot témoin avec les doses de cyperméthrine suivantes: 0,04 ; 0,08 ; 0,1 nmole/abeille à partir 60 minutes. Aucune différence n'a été observée entre le lot témoin et les lots ayant reçu 0,01 et 0,02 nmole/abeille et ce jusqu'à 120 minutes où la dose 0,01 nmole/abeille provoque une inhibition significative de l'activité ATPasique, qui ne tarde pas à retrouver un niveau identique au témoin. Par contre les autres doses(0,08 et 0,1) induisent un taux d'inhibition significativement différent des témoins jusqu'à la fin de l'essai ( $P < 0,05$ ). A 180 minutes le taux d'inhibition le plus élevé (42 %) est atteint par la dose la plus élevée 0,1 nmole/abeille, qui reste aussi significativement différent des taux d'inhibition atteints par 0,04 et 0,08 nmole/abeille. Avec le fénitrothion (Fig. 38) le pourcentage d'inhibition suit la même allure que pour la cyperméthrine, mais les % atteints par les doses (0,02 ; 0,04 ; 0,08 ; 0,1 nmole/abeille au bout de 180 minutes et qui entraînent une différence significative ( $P < 0,05$ ) par rapport au lot témoin restent inférieur (Maximum 32 % pour la plus haute dose 0,1 nmole/abeille) à ceux atteints avec la cyperméthrine. Si on compare les valeurs moyennes deux à deux des % d'inhibition atteints au cours des traitements par la cyperméthrine et le fénitrothion. Il apparaît nettement que l'activité ATPasique ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{k}^+$ ), a été plus inhibée (42%) en présence de cyperméthrine qu'en présence de fénitrothion (35%).



## 2. 2-Discussion

La perturbation de la transmission nerveuses chez les insectes sous l'effet des organophosphorés se situe principalement au niveau de l'acétylcholinestérase. En effet BRATSTEN (1990) ; IBRAHIM *et al.* (1974), KASTURI & CHANDRASHEKAR (1977) remarquent que le pourcentage d'inhibition de l'activité cholinestérasique est inféodé au degré d'empoisonnement dû aux insecticides organophosphorés. La phase d'intoxication est suivie par des séquences de tremblements qui envahissent tout le corps de l'abeille puis par une immobilité généralisée. Cette immobilité correspond effectivement à la phase d'abattement ou (Knock Down: K.D) que KASTURI & CHANDRASHEKAR (1977) ont pu observer quand le pourcentage d'inhibition de l'activité cholinestérasique était compris entre 50 et 70%. Dans notre cas, cette période a été observée à 60% d'inhibition de l'activité. Quant à l'activité ATPasique, le fénitrothion présente également un effet négatif, mais moindre que celui induit par la cyperméthrine.

L'action des pyréthrinoïdes et des organophosphorés sur l'activité nerveuse, est toujours discutée. Nos résultats permettent de comparer les perturbations nerveuses dûes aux deux classes de pesticides, sur quelques voies métaboliques de l'abeille (Fig. 39). On sait que les pyréthrinoïdes de synthèse sont capables, par leur action sur l'activité électrique de la fibre nerveuse (NARAHASHI, 1980 ; CLARK & MATSUMURA, 1982), d'induire des sécrétions neurohormonales (ORCHARD, 1980 ; NORMAN, 1980 ; SINGH & ORCHARD, 1982). La mise en évidence des modifications au niveau du métabolisme des glucides est un élément supplémentaire valident l'hypothèse d'une liaison entre l'effet des insecticides neurotoxiques sur la physiologie nerveuse et les troubles du métabolisme glucidique. Des études complémentaires sur un pyréthrinoïde de synthèse la bioresméthrine ( SINGH, 1982 ; SINGH & ORCHARD.,1983) permettent de relier les perturbations bioélectriques au niveau du corpora cardiaca à des sécrétions de vacuoles agissant directement sur la régulation de la lipémie chez

la Blatte. La cyperméthrine et le fénitrothion semblent donc interférer avec les sécrétions neurohormonales et le métabolisme glucidique d'une part, et avec la quantité d'ATP synthétisée d'autre part. Cependant comme l'énergie de l'abeille dépend du glucose en premier lieu, ce dernier subit un effet régulateur qui serait neurohormonal, quoique le siège de cette activité soit toujours sujet à discussion.

La différence entre l'effet des deux insecticides sur les perturbations métaboliques que nous venons de voir, nous permet, en effet, de retenir les points essentiels suivants:

1-Les mécanismes biochimiques d'action mis en jeu et les manifestations observés lors de l'intoxication par des doses sublétales de la cyperméthrine et du fénitrothion, semblent ne pas être les mêmes. Par exemple une forte diurèse a été observée seulement chez les abeilles traitées à la cyperméthrine.

2-La différence entre les conformations stériques des deux insecticides, peut aussi induire une différence de réponse basée sur la spécificité des sites d'attaque.

3-Dans le cas général, la cyperméthrine apparaît plus toxique envers les abeilles que le fénitrothion.

Les abeilles ramènent souvent du nectar et du pollen contaminés par des doses tellement infimes qu'elles ne provoquent aucune répulsion. Ces aliments contaminés sont d'abord stockés puis consommés au fur et à mesure par les colonies, introduisant généralement des doses qui ne provoquent aucune mortalité brusque ou massive à court terme. Mais est ce que l'introduction dans les ruches de ces aliments et leur consommation à très long terme, n'induisent pas une perturbation dans l'évolution générale des colonies et un affaiblissement dont la résultante serait, à terme la perte du cheptel apicole ? C'est ce que nous avons essayé de mettre en évidence dans le chapitre qui suit.

**C-ACTION DU CYMBUSCH (Cyperméthrine 100g m.a/l) SUR DES COLONIES D'ABEILLES  
SUR LE TERRAIN**

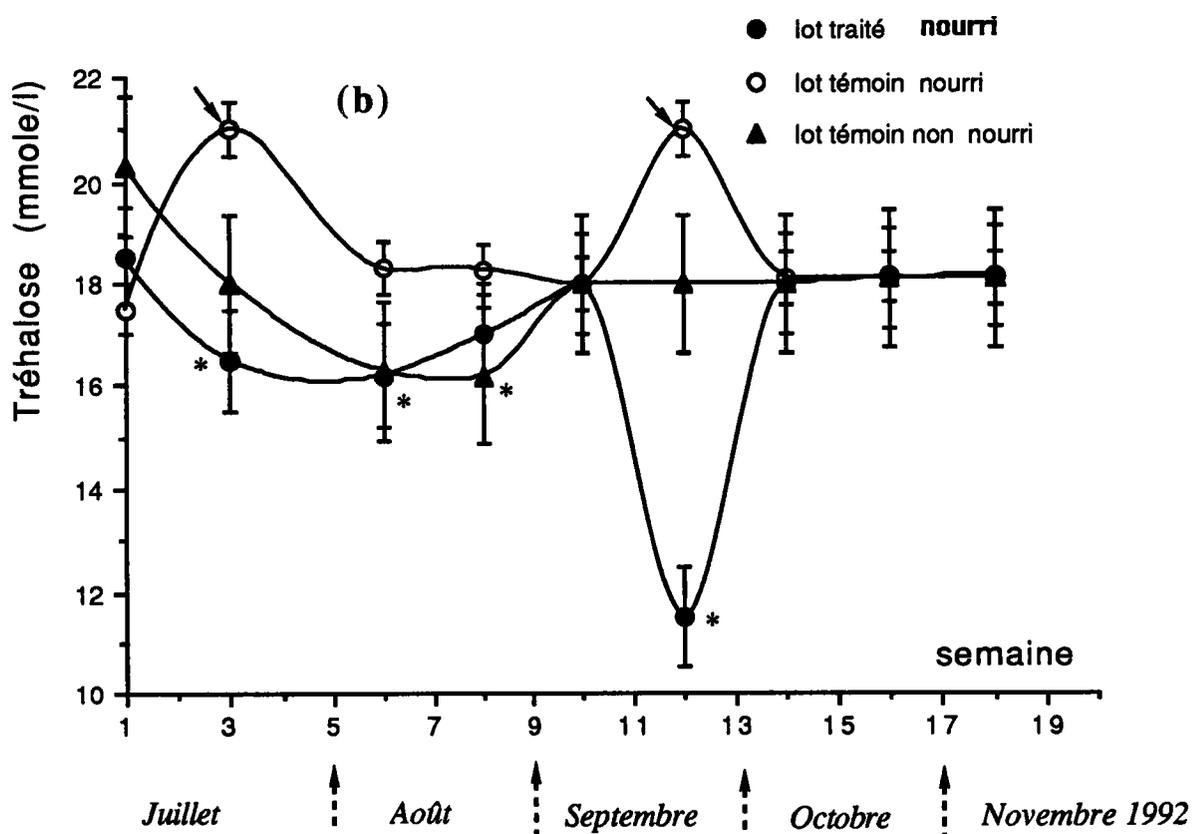
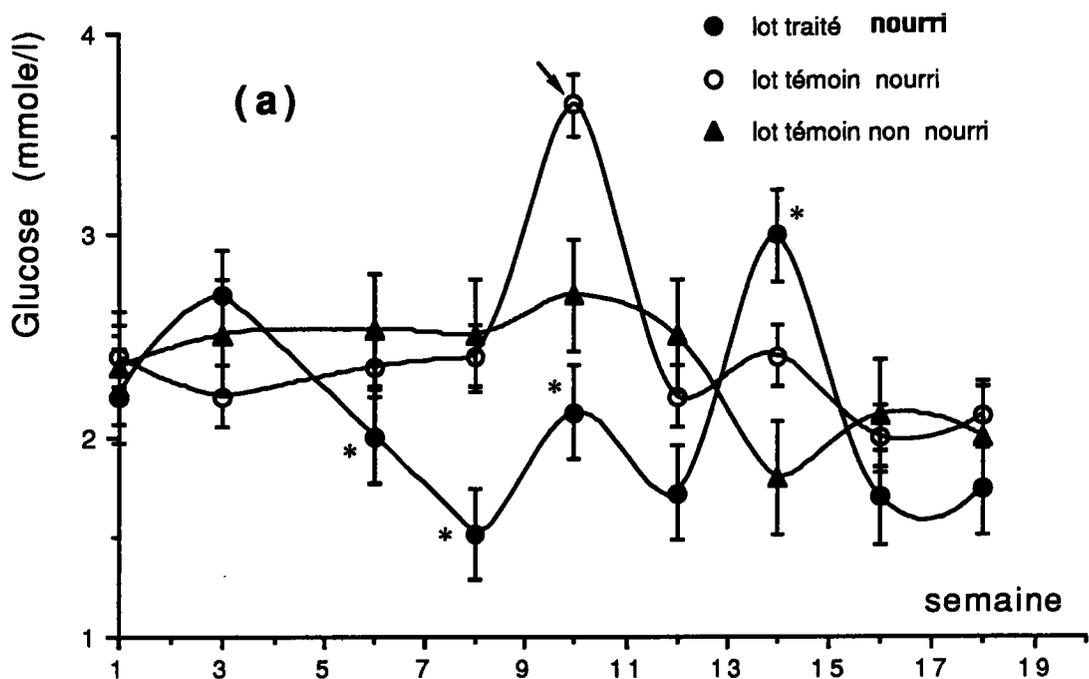
## 1-Résultats

La cyperméthrine a été retenue pour tester l'effet des pyréthrinoïdes sur l'évolution générale des colonies d'abeilles sur le terrain. La cyperméthrine est introduite sous forme de produit phytosanitaire (cymbusch: 100 g de matière active/litre d'éther de pétrole) à raison de 30 nmoles/litre de sirop de saccharose/ruche/semaine pendant 14 semaines. Ensuite les ruches évolueront sans aucun nourrissage. La cyperméthrine a été choisie pour deux raisons principales:

**a-**le principal but de cette recherche étant de voir si des insecticides introduits dans les ruches à des doses sublétales provoquent des perturbations dans l'organisation générale des colonies d'abeilles. Il se trouve que la cyperméthrine a été souvent détectée dans l'analyse des échantillons (pollen et plantes) de l'enquête écopathologique (FLECHE *et al.*,1985).

**b-**Nous ne pouvions prétendre faire de même pour le fénitrothion dans le cadre de cette thèse. Compte tenu de la lourdeur de la mise en place et du nombre d'observations à faire, il n'était matériellement pas possible de mener de front les deux expérimentations dans des conditions suffisantes de précision.

En ce qui concerne les perturbations biochimiques, nous nous sommes intéressé aux éventuelles variations de la glycémie et de la tréhalosémie, ainsi que de l'ATPase, cibles privilégiées des pyréthrinoïdes comme nous l'avons déjà vu. L'essai a duré toute la saison d'été. Pour ce qui est de l'action de la cyperméthrine sur la biochimie de la colonie: notre but n'était pas de suivre la glycémie et la tréhalosémie sur un même groupe d'abeilles durant les 18 semaines (ce qui est d'ailleurs impossible vu la durée de vie des abeilles en cette saison 40 jours dans les meilleures conditions), mais plutôt de voir si une alimentation continue avec des doses sublétales, entraînerait des modifications dans l'évolution de la progéniture et du comportement de l'ensemble des colonies en général.



**Figure 40:** Evolution de la glycémie(a) et de la tréhalosémie(b) en (mmole/l) durant 18 semaines dans les colonies d'abeilles traitées à la cyperméthrine et les lots témoins

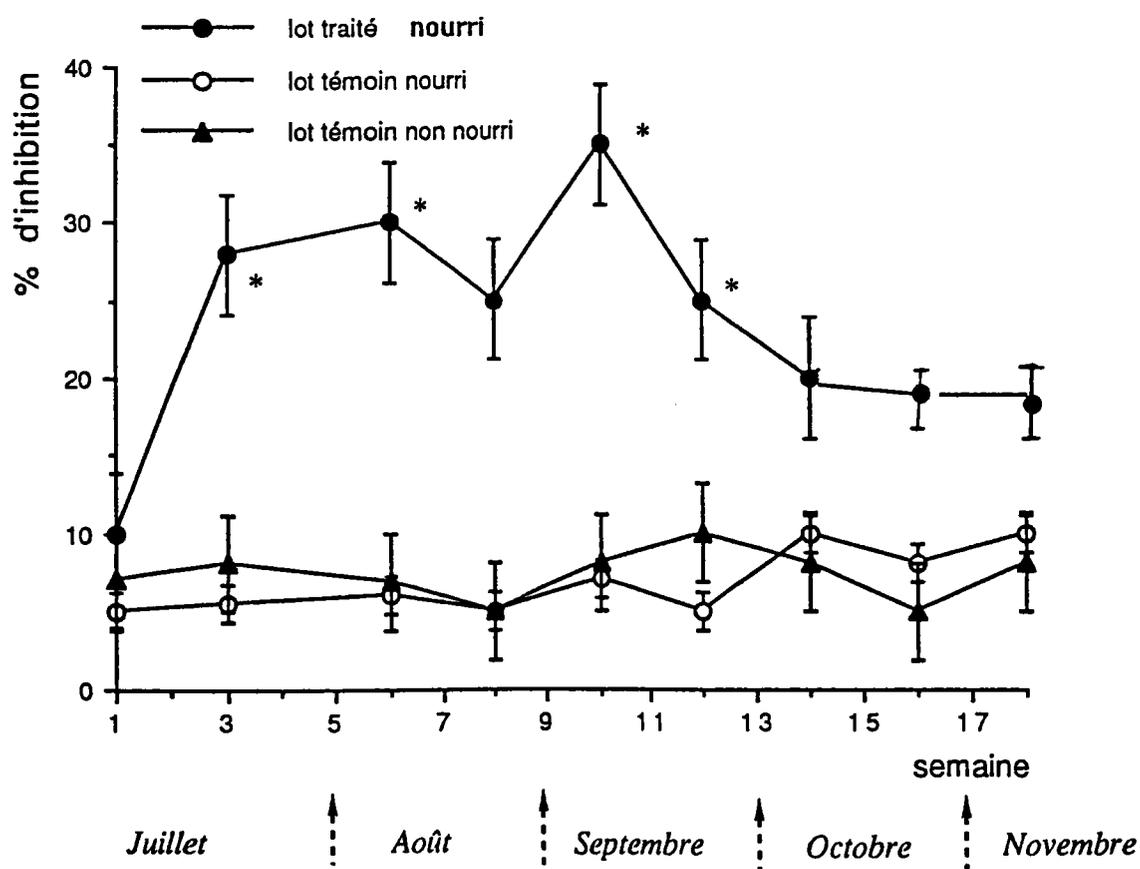
\*: différences significatives entre lot traité et les lots témoins ( $P < 0,05$ )

→: différences significatives entre les deux lots témoins.

## 1.1-Perturbations biochimiques.

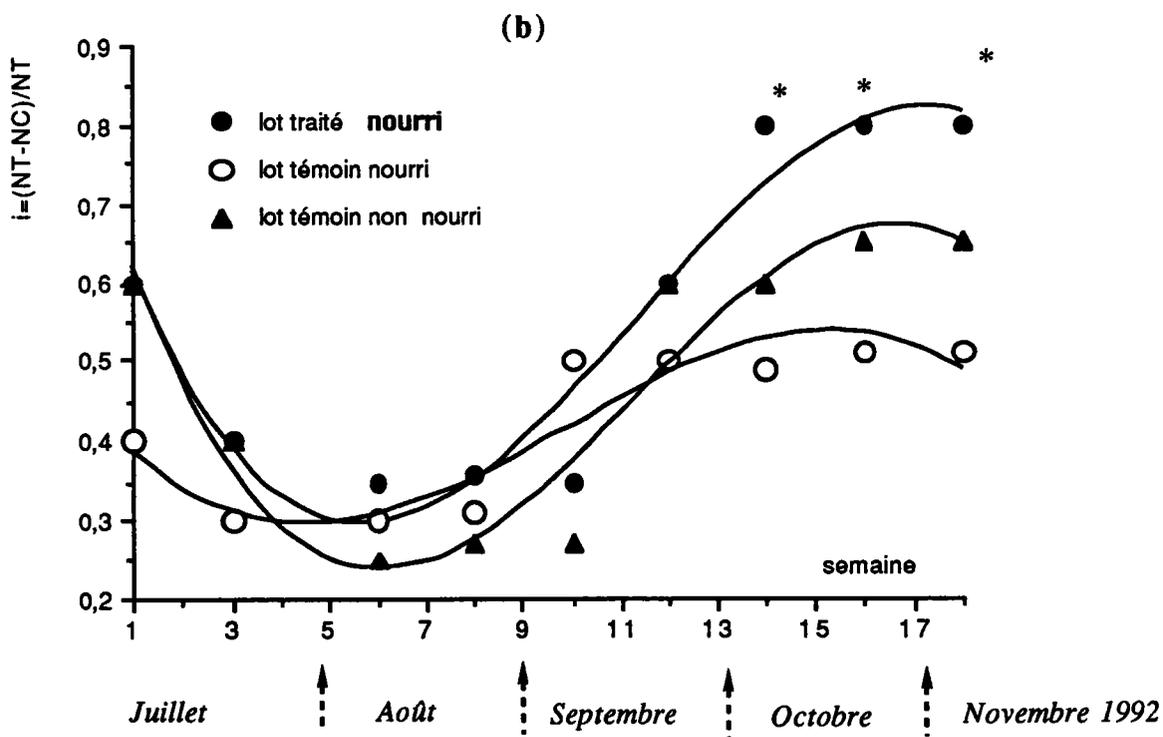
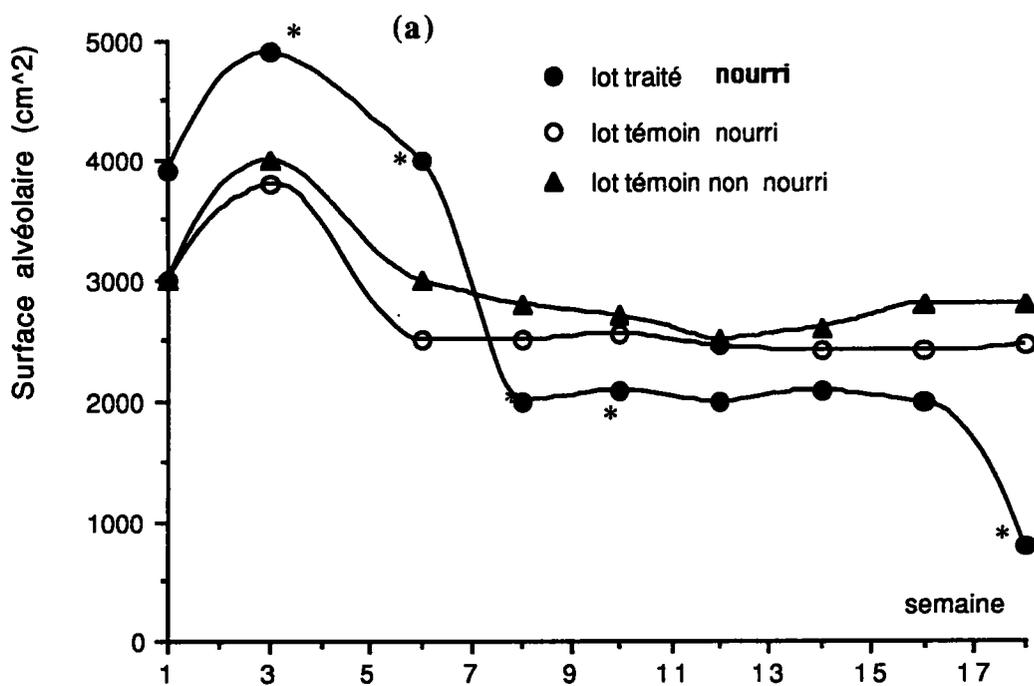
**1.1.1-Les glucides:** Les courbes des figures 40a et 40b, montrent l'évolution des deux composantes glucidiques (glucose et tréhalose) chez les abeilles des lots témoins et dans le lot traité, ayant reçu en nourrissage continu contenant de la cyperméthrine à la concentration de 30 nmoles/l/ruche. Les variations du glucose durant les 18 semaines d'essai présentent des fluctuations dont l'interprétation est délicate. Le lot traité accuse une hyperglycémie significativement différente par rapport au lot témoin nourri à la semaine 3. De la semaine 4 et ce jusqu'à la semaine 12 l'hypoglycémie reste toujours présente et significativement différente des deux lots témoins. A la semaine 14 (semaine où nous avons arrêté de nourrir et de traiter pour laisser les colonies évoluer d'une manière autonome), le lot traité montre une hyperglycémie. Les ruches du lot témoin supplémenté au sirop de saccharose, présentent un pic (3,7 mmole/l) dans la glycémie à la semaine 10, alors que chez le lot témoin n'ayant rien reçu, ce pic est pratiquement absent. Chez le lot traité, ce pic existe mais il n'apparaît qu'à la semaine 14. Au delà de la semaine 14 les trois lots ne présentent plus de différence dans leur taux de glucose. En ce qui concerne le tréhalose, le lot traité présente une hypotréalosémie aux semaines 3, 6 et 8. Mais l'hypotréalosémie la plus spectaculaire est atteinte à la semaine 12 (11,5 mmole/abeille). Le lot témoin non nourri ne présente de différence avec le lot traité qu'à la semaine 12 alors que le lot témoin nourri présente deux pics d'hypertréalosémie à la semaine 3 et 12. Le nourrissage provoquerait donc une arrivée massive de saccharose dans l'hémolymphe et les glucosidases le coupent en glucose et fructose à partir desquels il se reforme du tréhalose. A part cette particularité, les variations ne présentant aucune autre zone intéressante, si ce n'est la mise en évidence de variations saisonnières dans le taux des différents métabolites chez l'abeille. Au bilan, la cyperméthrine installe un déficit glucidique marqué à la fois précoce et prolongé.

**1.1.2-Activité ATPasique:** Les courbes de la Figure 41 montrent l'évolution du pourcentage d'inhibition de l'activité ATPasique dans les 3 lots de ruches. Dès la première semaine du traitement apparaît une inhibition significative ( $P < 0,01$ ) dans le lot traité par rapport aux deux lots témoins qui ne présentent aucune différence entre eux. Cette inhibition se maintient jusqu'à l'arrêt du traitement à la semaine 14. Le pourcentage d'inhibition oscille entre 20% et 35% , le maximum est atteint à la semaine 10. La cyperméthrine semble donc affecter d'une manière importante l'activité ATPasique des colonies traitées.



**Figure 41:** Evolution du % d'inhibition de l'activité ATPasique à la suite du traitement à la cyperméthrine des colonies d'abeilles sur le terrain.

\*: différence hautement significatives entre le lot traité et les lots témoins ( $P < 0,01$ ).



**Figure. 42:** Evolution de la surface totale du couvain en (cm<sup>2</sup>) (a) et de l'indice de d'occupation des cadres par les réserves dans le lot traité à la cyperméthrine et les lots témoins.

NT: nombre total des cadres

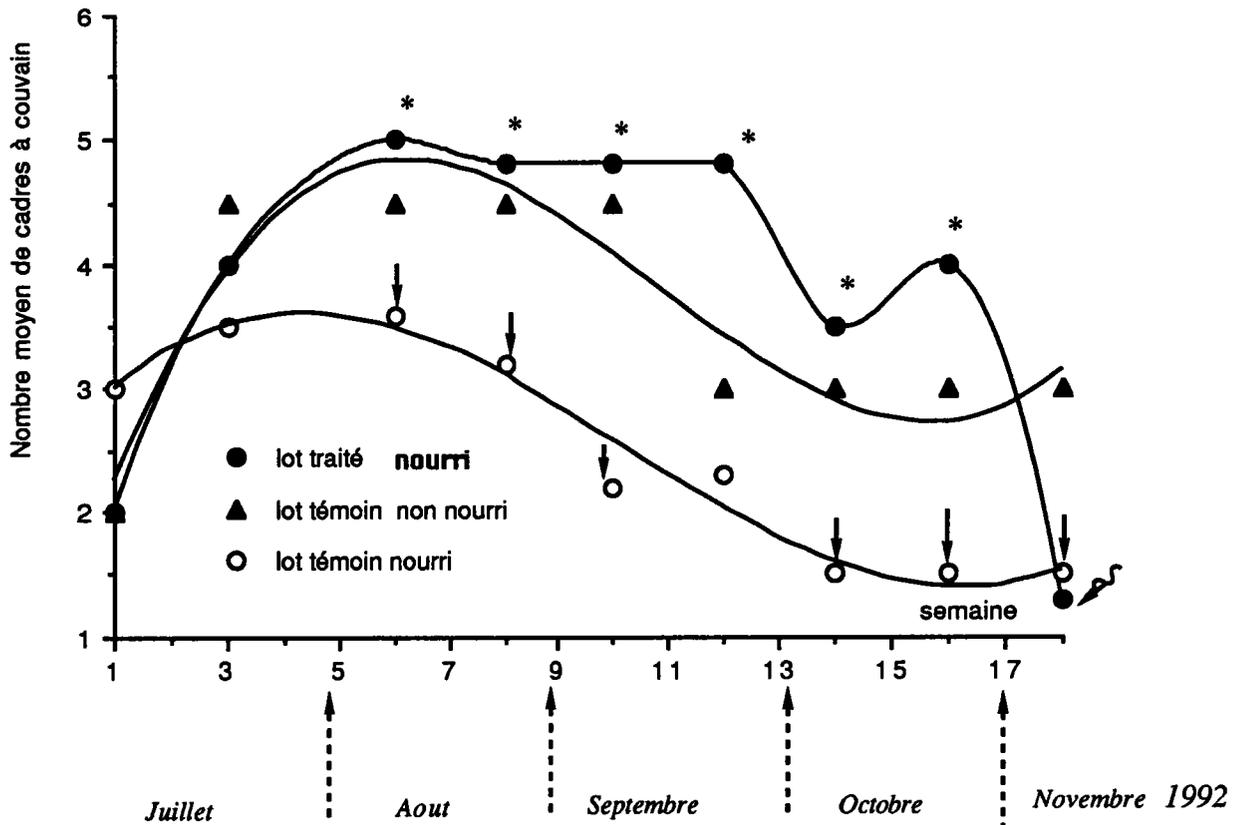
NC: nombre des cadres à couvain

i: indice d'occupation par les réserves

\*: différence significatives entre le lot traité et les lots témoins (P<0.05)

## 1. 2-Les surfaces alvéolaires.

La figure 42a, présente l'évolution des surfaces alvéolaires dans les 3 lots de ruches pendant 18 semaines d'essai. L'allure générale des courbes montre d'abord un pic qui témoigne d'une stimulation de la ponte chez les 3 lots de ruches à la semaine 3, avec une différence significative entre les lots témoins et le lot traité jusqu'à la semaine 5 où paradoxalement c'est le lot traité qui semble accuser une stimulation quant à la surface alvéolaire. Aux semaines 8 et 10, et 18 le phénomène s'inverse nous avons remarqué une diminution significative ( $P < 0,05$ ) de la surface alvéolaire chez le lot traité par rapport aux 2 autres lots témoins. Entre les deux lots témoins aucune différence n'a été observée. La figure 42b nous renseigne sur l'évolution interne des ruches. L'indice d'occupation (i) indique la part qu'occupent les cadres de réserves par rapport aux cadres à couvains. L'indice i diminue jusqu'à la semaine 6, ce qui signifie que dans la ruche les cadres affectés aux couvains l'emportent sur ceux des réserves, traduisant la forte activité de ponte de la reine. Cet indice ne tarde pas à augmenter dans les trois lots, mais la différence reste hautement significative entre les lots témoins et le lot traité à partir de la 16ème semaine. Cette augmentation de l'indice de cadres occupés par les réserves va de pair avec la diminution de cadres à couvains (Fig. 43). Cela voudrait dire que face à la déficience de la ruche en couvain, les abeilles comblent donc le vide par des réserves en miel et pollen, d'où l'augmentation des cadres à réserves. l'augmentation du nombre de cadres à couvain chez le lot traité par rapport à ceux des lots témoins ne veut pas dire une augmentation de la surface alvéolaire, mais seulement la reine répartit sa ponte sur plus de cadre si bien que la surface alvéolaire reste toujours inférieure de la semaine 8 jusqu'à la fin de l'essai.



**Figure 43:** Evolution du nombre moyen de cadres à couvain dans les trois lots de ruches.

\*: différence significative entre le lot traité et le lot témoin nourri ( $P < 0,05$ )

→: différence significative entre les deux lots témoins ( $P < 0,05$ )

~~~~~: différence significative entre le lot traité et le lot témoin non nourri ( $P < 0,01$ ).

Par contre dans le cadre de cette expérience, aucune différence significative n'a été observée entre le lot traité et les lots témoins, sur le nombre de cellules avortées recensées sur 7 générations (Tab. 18).

**Tableau 18:** Nombre moyen ( $x \pm \sigma$ ) de cellules avortées, recensées sur 100 alvéoles/ruche, pendant 7 générations au cours de l'essai sur le terrain dans les trois lots de ruches traitées et les deux lots témoins.

| Lots                             | Traité            | Témoins nourris     | Témoins non nourris  |
|----------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| -----<br>Ruches                  |                   |                     |                      |
| 1                                | 4                 | 49                  | 36                   |
| 2                                | 8                 | 84                  | 70                   |
| 3                                | 83                | 26                  | 47                   |
| 4                                | 56                | 34                  | 28                   |
| 5                                | 32                | 43                  | 25                   |
| 6                                | 77                | 84                  | 23                   |
| <b><math>x \pm \sigma</math></b> | <b>43 ± 34,03</b> | <b>53,3 ± 25,01</b> | <b>41,17 ± 17,90</b> |

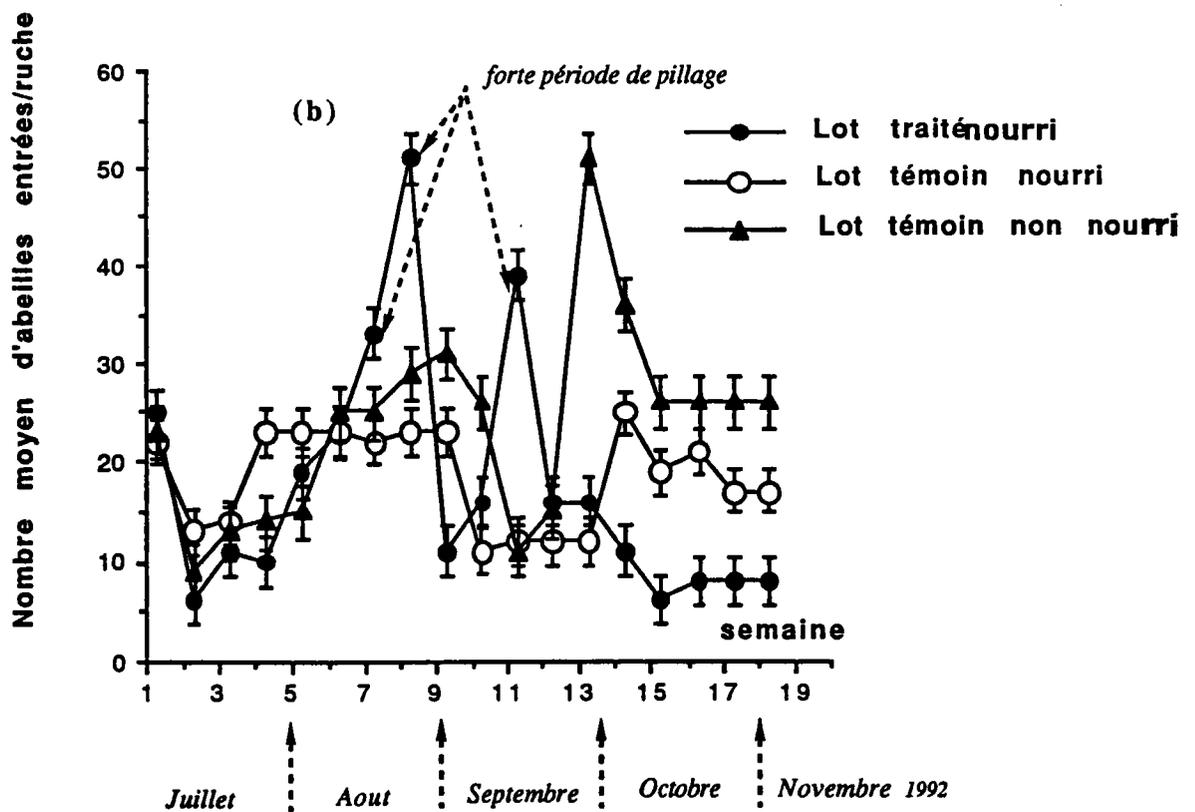
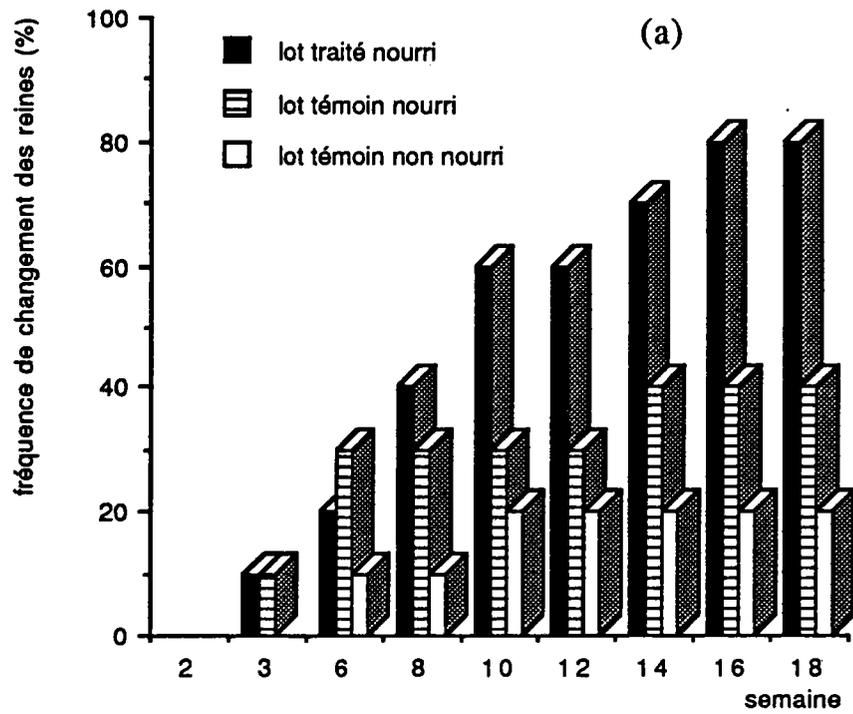
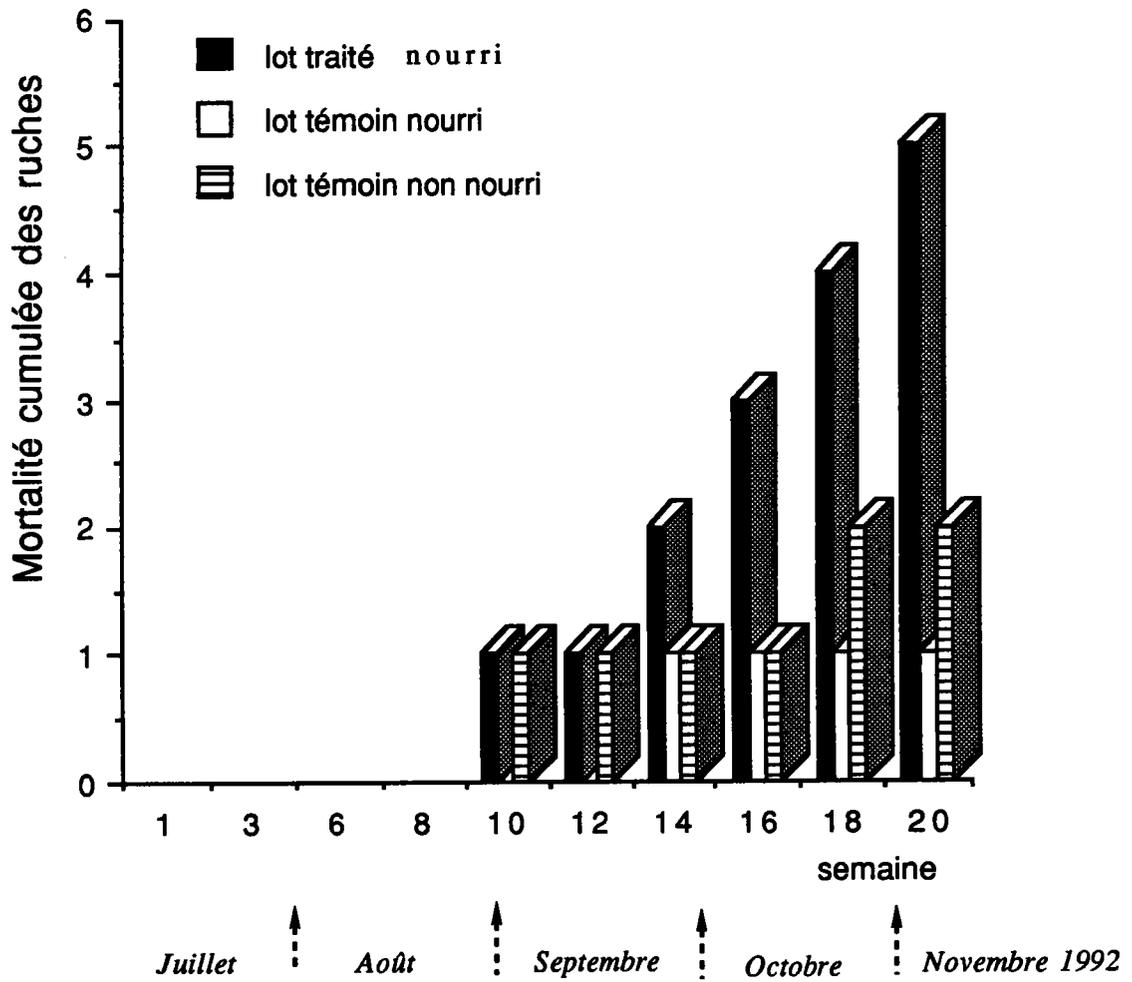


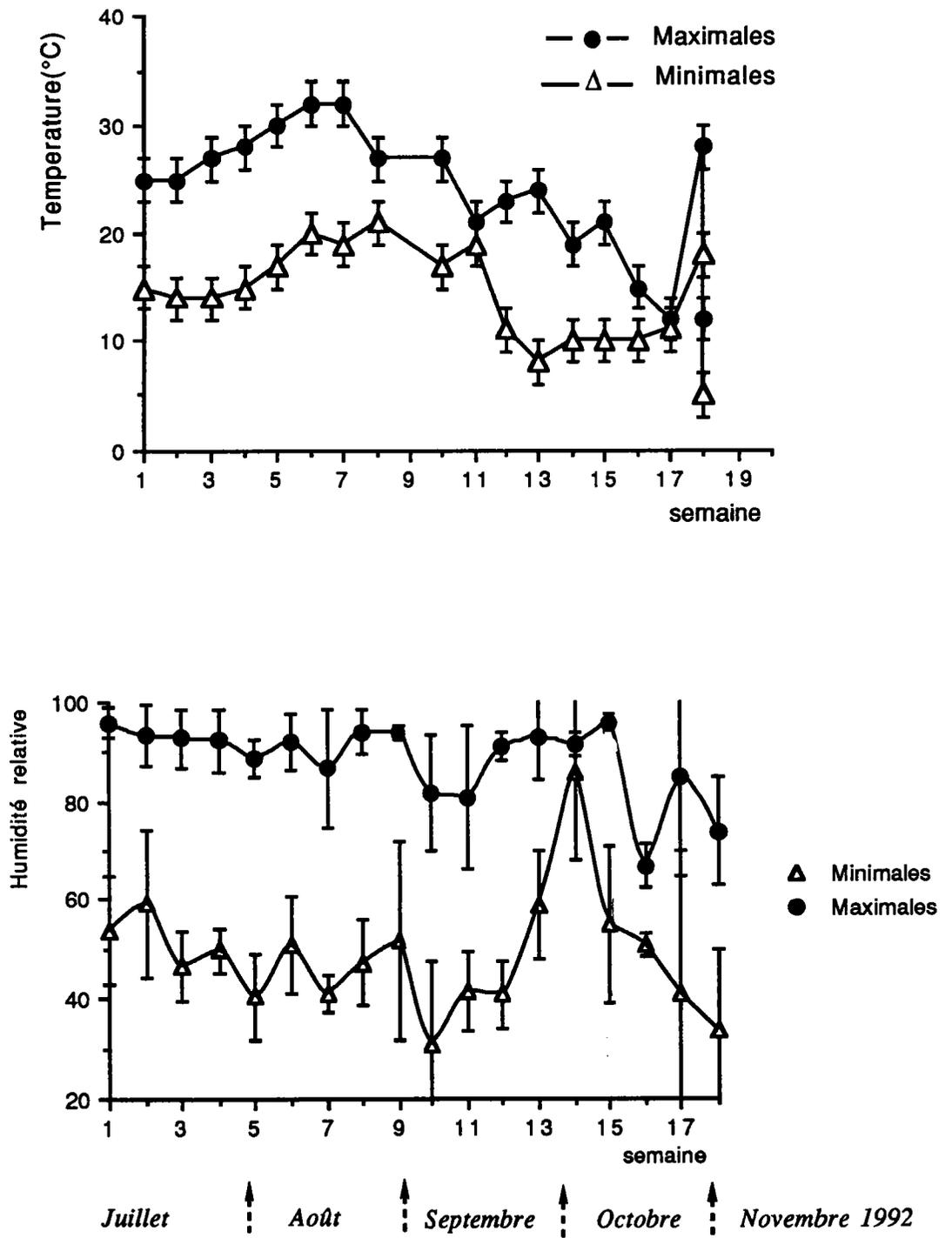
Figure 44: Fréquence des changements de reines "supersédure" (a) et variation de l'activité/minute (b) au sein des 3 lots de ruches.

### 1. 3-Comportement et activité des abeilles.

Dans les conditions normales, la cause principale de l'affaiblissement d'une ruche est le non renouvellement continu de la population. Ceci peut être une conséquence soit aux problèmes d'approvisionnement nutritionnels, soit de la disparition de la reine, soit de sa baisse de fécondité, ou l'interférence avec des maladies. Dans le cadre de l'essai au bout de 16 semaines 80% des ruches du lot traité ont changé leur reine, contre 40 % dans le lot témoin nourri et 30 % dans le lot témoin non nourri (Fig. 44a). L'activité des abeilles (Fig. 44b) n'accuse jusqu'à la semaine 7, aucune différence significative entre les 3 lots de ruches. Aux semaines 8 et 11, le lot traité présente une activité apparente supérieure à celle des lots témoins, ensuite l'activité des ruches traitées devient significativement inférieure à celles des témoins. En fait, la période de forte activité du lot traité coïncide parfaitement avec un phénomène de pillage qui s'est installé aux mêmes semaines 8 et 11. Ainsi beaucoup d'abeilles des ruches voisines qui venaient piller les ruches traitées devenues très faibles, ont été comptées parmi les abeilles traitées, car la distinction entre les butineuses des différents lots était impossible, d'où la *"pseudo forte activité"* du lot traité enregistrée aux semaines 8 et 11. La conséquence directe de ces perturbations à long terme est la mort des ruches (Fig. 45). La mortalité commence à la semaine 10 dans le lot traité et le lot témoin non nourri. Le lot supplémenté au sirop n'est atteint qu'à partir de la semaine 14 et ne perdra qu'une seule ruche tout au long de l'essai (14 %). Le lot témoin non nourri aura perdu 28 % des ruches par contre le lot traité arrivera à la fin de l'expérience avec 71 % de perte.



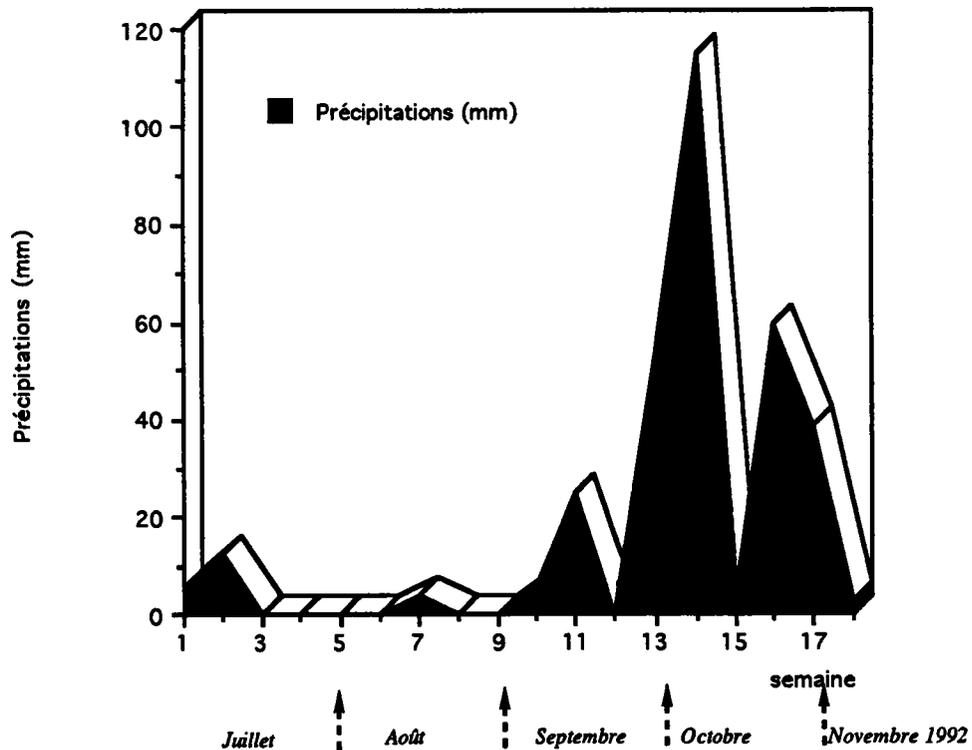
**Figure 45:** Evolution du nombre cumulé de colonies mortes au sein du rucher expérimental durant l'essai.



**Figure 46** Variation des valeurs moyennes de la température et de l'humidité relative durant 18 semaines d'essai sur le terrain. Les barres verticales représentent les écarts types

#### 1. 4-Variations des paramètres climatiques dans le site expérimental

La température, l'humidité et les précipitations (Fig.46 et 47) n'ont pas été très différentes des moyennes enregistrées lors des années précédentes, par comparaison avec les relevés de la météorologie nationale basée à Nice. Cependant l'humidité a marqué cette année un saut considérable vers la 14<sup>ème</sup> semaine où le taux a atteint 98% le jour comme la nuit à cause des fortes précipitations qui ont eu lieu à cette même date (Fig. 47). A part cette particularité, on peut dire que les paramètres climatiques sont restées, conformément aux moyennes qui nous ont été communiquées par la météorologie nationale à Nice.



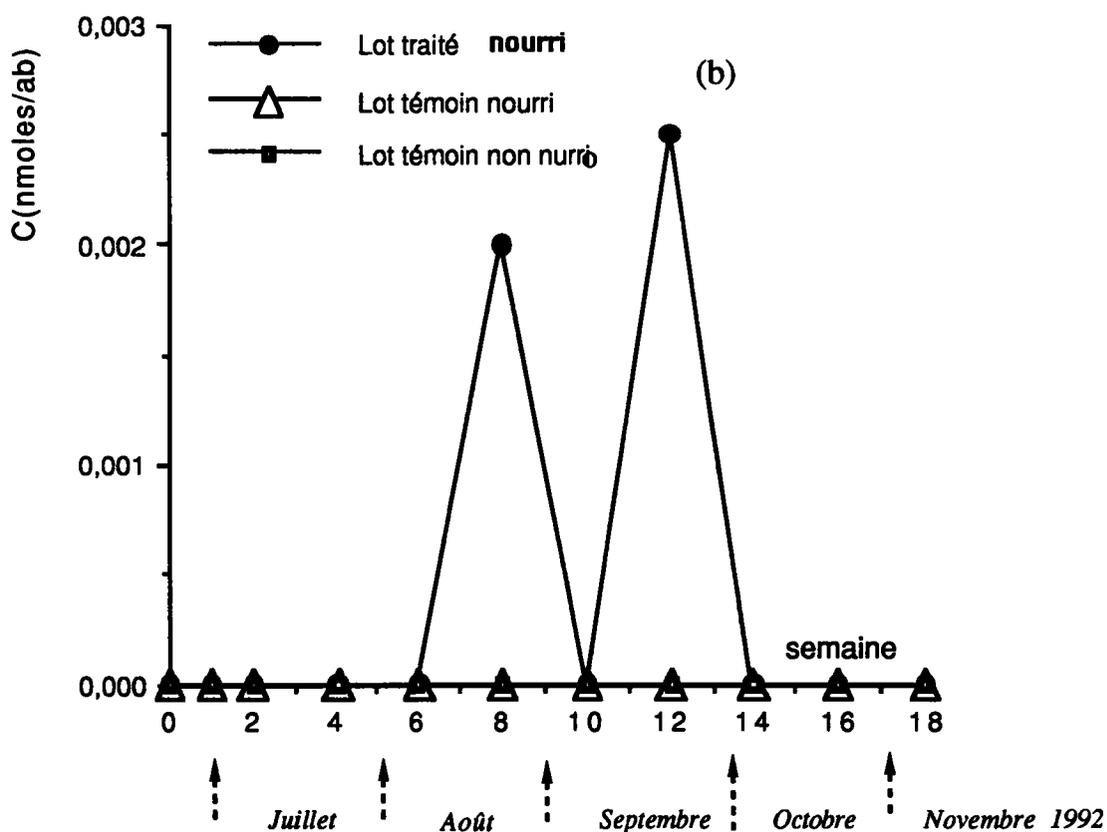
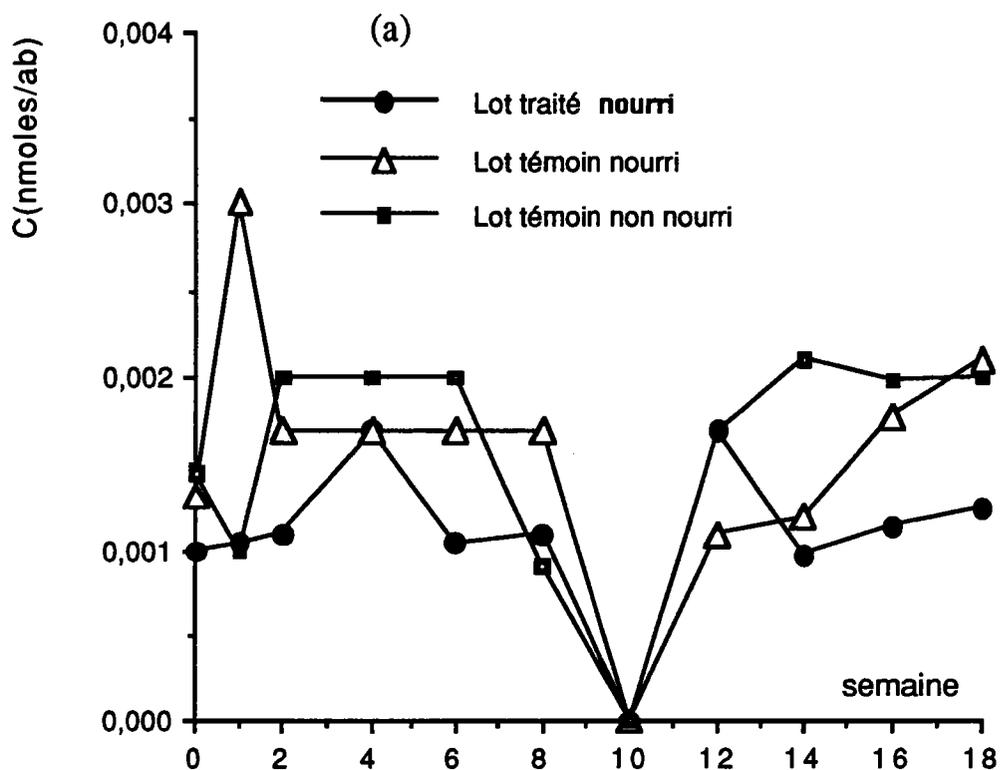
**Figure 47:** Les précipitations tombées sur le site durant les 18 semaines d'essai.

### 1. 5-Analyses polliniques

En analysant le tableau (Tab.19): On assiste à une inversion au cours du temps des espèces végétales visitées par les abeilles comme en témoigne l'analyse des pollens dominants. A la semaine 5 le myrte est dominant, alors que le plantain et le lierre sont peu présents. A partir de la semaine 7 il y a inversion des pollen dominants.

**Tableau 19:** Analyse pollinique effectuée au laboratoire pendant l'essai sur le terrain, sur le pollen récolté par les abeilles.

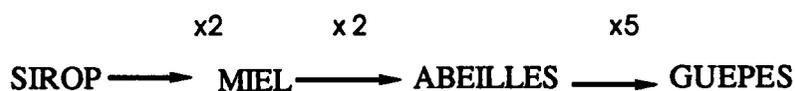
| Semaine | Pollens dominants                  | Pollens isolés                                  |
|---------|------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1       | Myrte commun                       | Plantin, Asphodèle, Monocotylédone              |
| 3       | Myrte commun                       | Vipérine, Asphodèle, Plantin,<br>monocotylédone |
| 5       | Lierre, Mimosa, Plantin            | Myrte, Helianthus, Mauve                        |
| 7       | Asparagus, Pissenlit               | Plantin, Mimosa                                 |
| 9       | Lierre, Mimosa, Pissenlit          | Asparagus, Plantin, Myrte, Ciste                |
| 12      | Plantin, Mimosa,<br>Chénopodiacées | Bruyère, Illacées, Graminées, Lierre            |
| 15      | Plantin, Mimosa,<br>Chénopodiacées | Myrte, Scabreuse, Ciste, Lierre                 |
| 18      | Lierre et Composées                | Pissentti, Chêne, Plantin, Crucifère            |



**Figure 48:** Analyse des résidus d'insecticides, lindane(a) et cyperméthrine (b).dans les abeilles vivantes (200 abeilles/analyse).

### 1. 6-Analyse toxicologiques et pathologiques

Les analyses toxicologiques du le pollen, avant l'essai, n'ont révélé que des traces de lindane et de soufre à des taux inférieurs à  $2,4 \cdot 10^{-5}$  nmole/g de pollen provenant certainement des traitements des cultures voisines. Par contre à aucun moment de l'expérience nous n'avons constaté la présence de cyperméthrine dans le pollen, donc la seule et unique source de cyperméthrine reste effectivement la nôtre. Mais on ne peut strictement affirmer que l'intervention d'autres pesticides n'a pu avoir lieu. L'analyse des résidus (Fig. 48a) a révélée, dans les abeilles vivantes, du lindane à l'état de traces dans les trois lots de ruches entre 0 et 0,003 nmole/abeille. Quant à la cyperméthrine, elle a été détectée à 3 reprises: Une fois dans le miel des lots traités ( $1,27 \cdot 10^{-3}$  nmoles/g), deux fois à raison de  $2,1 \cdot 10^{-3}$  nmoles et  $2,6 \cdot 10^{-3}$  nmoles/abeille dans les abeilles traitées, et une fois dans les guêpes (Apivores: qui se nourrissent d'abeilles entre autres) à un taux très élevé  $9,4 \cdot 10^{-3}$  nmoles/abeille. Ces guêpes proviennent des nids qui se sont formés autour des ruches. Cette dose qui est 5 fois plus élevée que chez les abeilles traitées prouve que la cyperméthrine s'accumule le long de la chaîne alimentaire d'une part, et d'autre part que la cyperméthrine subit une concentration avec un coefficient ( $k = 5$ ) chez les prédateurs.



#### Flux de la cyperméthrine et coefficient apparents de transfert

Par contre rien n'a été détecté dans la cire fabriquée fraîchement fabriquéé par les abeilles, sauf quelques traces de fluvalinate ( $2,6 \cdot 10^{-3}$  nmoles/g de cire), mais qui existaient déjà avant l'essai. L'analyse toxicologique des abeilles mortes n'a été faite qu'une seule fois sans détecter de cyperméthrine. Aucun signe pathologique ni de

comportement suspect à l'extérieur des ruches n'ont été observé dans les trois lots de ruches sur le terrain. Quant à la cinétique de dégradation de la cyperméthrine dans le sirop de saccharose elle a été suivie pendant 5 jours au laboratoire (Fig. 49a). Cette courbe est une sigmoïde descendante qu'on peut traiter par :  $C_0/C_t = (t/T_{50})^n + 1$  dont la régression linéaire (Fig. 49b) la période  $T_{50}$  en jours de 36 jours.

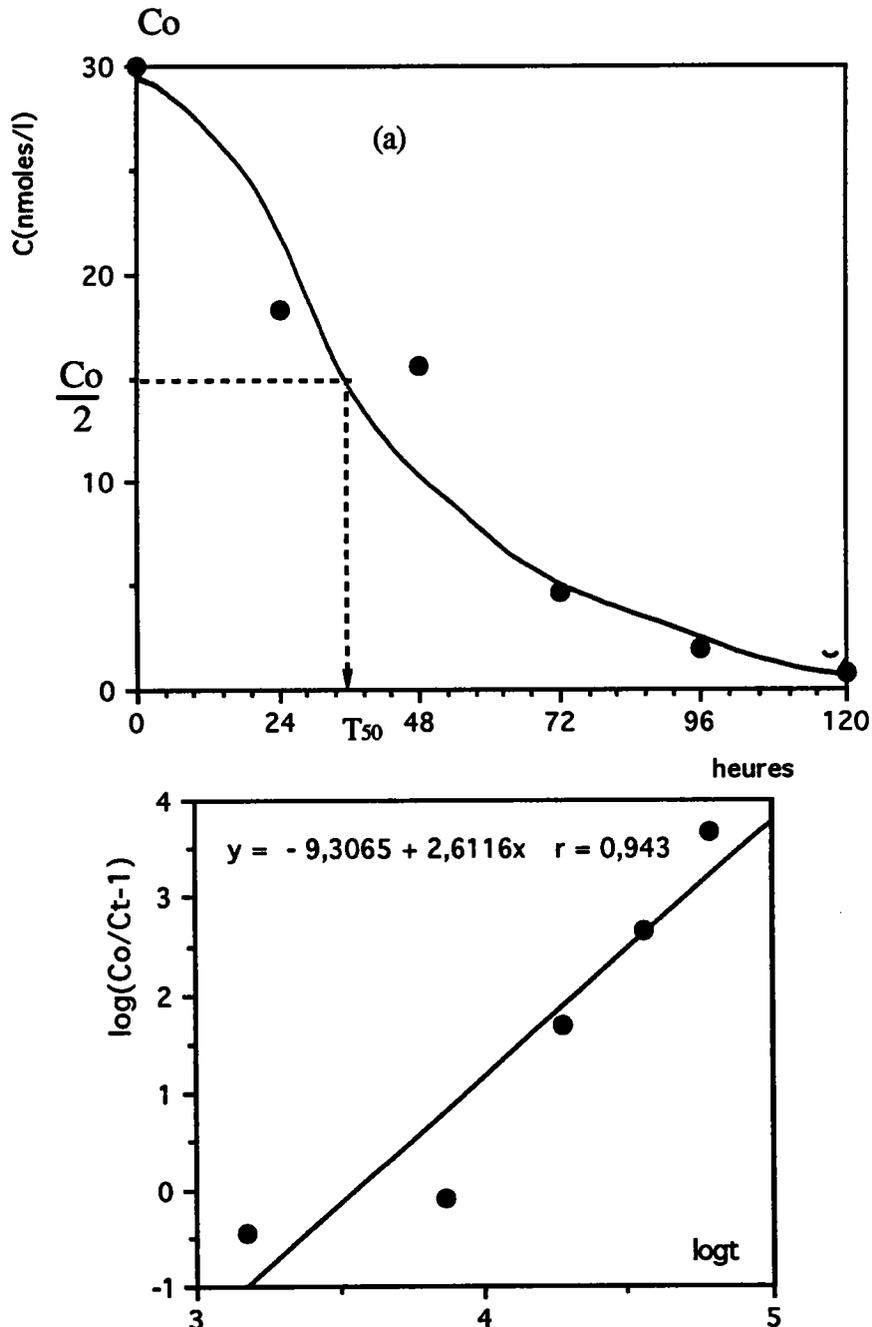


Figure 49: Cinétique de dégradation de la cyperméthrine dans du sirop de saccharose pH 6,8



**Photo 8:** Composition du rucher à la fin de l'essai sur le terrain, lot traité nourri (A), lot témoin nourri au sirop de saccharose (B).



**Photo 9:** Les ruches du lot témoin non nourri (C) après 18 semaines d'essai.

## 2-DISCUSSION

### 2. 1-Répulsivité de la cyperméthrine

L'abeille subit directement ou indirectement l'action des insecticides lors des traitements des cultures dans les champs, et même longtemps après (CLINCH *et al.*, 1973 ; SCHIRO, 1986 ; FAUCON *et al.*, 1986b ; MANSOUR & AL-JILALI, 1984, 1985 ; NATION *et al.*, 1986). COX & WILSON (1984) constatent que les abeilles subissent une répulsion vis à vis de la cyperméthrine dans une gamme de concentration comprise entre 12 et 48 nmoles/l. FRIES & WIBRAN (1986) à la suite d'un traitement à la cyperméthrine en plein champs à 10,1 mole de matière active/ha, notent que les résidus de la cyperméthrine sont détectés du 6<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour après épandage et que la répulsion dure jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour. De leur part DELABIE *et al.*(1985a) confirment la répulsivité de la cyperméthrine, et estiment que la quantité réellement émise dans les champs est  $450 \times 10^6$  fois inférieure à la DL50 et ne constatent aucun résidu dans les ruches ni dans le pollen. Nous n'avons constaté, pour notre part aucune répulsion à la dose administrée dans nos ruches (30 nmoles/l/ruche). La totalité du sirop était consommé dans les 24 heures qui suivaient.

Mais qu'arrive t-il quant la teneur en cyperméthrine n'est plus répulsive?

### 2. 2-Perturbations comportementales

Les pyréthriinoïdes peuvent effectivement affecter les colonies d'abeilles après traitement à des doses largement inférieures à celles permises comme cela a été bien démontré lors de notre expérimentation sur le terrain et dont les résultats coïncident avec ceux de CAZANEVE *et al.* (1980), HARIS & TURNBULL (1978), SHIRES *et al.* (1984). Ces derniers auteurs après un traitement à la cyperméthrine (cymbush) à des doses de 0,02 et 0,04 mole/ha, notent que les colonies d'abeilles subissent des troubles considérables dans la récolte du pollen, des visites des fleurs et enfin induisent une forte mortalité à long terme. De leur côté COX & WILSON (1984) observent après un traitement à la cyperméthrine, que seulement 43% des abeilles butineuses arrivent à retrouver le

chemin des ruches. Des modifications dans la communication entre les abeilles et notamment la danse en zig zag qui informe sur la position exacte d'une source de nourriture, prend un angle aberrant par rapport au soleil (SHRIKER, 1974).

### **2. 3-Perturbations biochimiques**

En ce qui concerne les perturbations métaboliques, nous avons pu observer une diminution d'activité ATPasique du glucose et du tréhalose dans le lot traité. En plus de cette inhibition nous avons noté aussi des variations vraisemblablement liées aux fluctuations normales et à l'apport hebdomadaire de sirop. KUNERT & CRAILSHEIM (1988) ainsi que CRAILSHEIM (1985, 1986) constatent qu'en l'absence de toute intoxication, le métabolisme glucidique subit des fluctuations en fonction des saisons.

### **2. 4-Effet de la cyperméthrine sur le couvain**

Quant à la surface alvéolaire, elle a montré une nette régression chez le lot traité à la cyperméthrine. FRIES & WIBRAN (1986) observent qu'un traitement à la cyperméthrine à 0,04 mole/ha entraîne une diminution dans la surface du couvain et que la cyperméthrine a davantage tendance à persister dans le pollen. ATKINS & KELUM. (1986) à l'aide de microgouttes déposées directement sur les larves démontrent que la cyperméthrine possède effectivement une action négative sur les abeilles du stade larvaire jusqu'au stade adulte. FERGUSSON (1989) démontre que les pyréthriinoïdes introduits à des doses sublétales provoquent la diminution de la surface alvéolaires par rapport aux lots témoins. A raison de 4,5 nmoles de cyperméthrine/g de pollen SHIRES *et al.*(1984) obtiennent une diminution de surface du couvain et de l'activité des abeilles dans les ruches au bout de trois mois. Nos résultats et ceux de la littérature montrent que du fait de la non répulsivité de la cyperméthrine à des doses inférieures à la DL50, cette molécule provoque des troubles dans la totalité de la colonie en empruntant le chemin de la chaîne alimentaire, tel qu'il a été suivi par les analyses toxicologiques, ou le

marquage radio-isotopique au  $^{198}\text{Au}$ , dans un autre cas expérimental (DELVERT-SALIERNO, 1963).

DAVIS & SHUEL (1988) et WITTMAN (1982) ont effectivement constaté que des insecticides marqués au  $^{14}\text{C}$  atteignent le couvain par l'intermédiaire des abeilles nourrices.

**Miel et pollen → butineuses → stockage → abeilles nourrices  
→ Reine → couvain.**

La simulation sur le terrain que nous avons faite a permis d'une part, de confirmer ce passage à travers la chaîne alimentaire (allant jusqu'à atteindre les prédateurs des abeilles, les guêpes) et d'autre part, de confirmer l'action nocive des pyréthrinoïdes sur le développement général des colonies.

L'origine de l'alimentation de la larve est double: directe et indirecte, le nourrissage direct se fait par simple régurgitation du miel stocké dans le jabot (HARDY & SKROBAL, 1976) alors que, l'alimentation indirecte correspond à l'apport protéique et lipidique qui provient des sécrétions des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires. La gelée royale est strictement réservée aux futures reines. Des études complémentaires sur le trajet que suivent les insecticides dans le circuit trophylaxique avant d'arriver aux larves, ont été effectuées par le marquage radio-isotopique des carbamates, ou des organophosphates et pyréthrinoïdes chez l'abeille nourricière. Le jabot, lieu de stockage des aliments (DOUAULT *et al.*, 1974), est pauvre en certaines enzymes de détoxification des insecticides, les oxydases (GILBERT & WILKINSON, 1974). De plus, DAVIS & SHUEL (1988), ainsi que WITTMAN (1982), remarquent que la plus importante quantité d'insecticide se retrouve dans le jabot. Donc, La cyperméthrine non métabolisée est régurgitée directement au couvain par la nourrice. Le risque est alors d'autant plus élevé que les larves sont nourries par plusieurs nourrices à la fois (REMBOLD

& CZOPPELT, 1982). Les nourrices sont donc le vecteur principal de l'aliment contaminé jusqu'aux larves. JOHANSEN *et al.*(1983) remarquent que les insecticides provoquent une régurgitation plus importante du miel donné aux larves. De ce fait la larve reçoit non seulement une nourriture polluée mais aussi distribuée en plus grande proportion. La réduction des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires sous l'effet des insecticides (BEETSMA *et al.*, 1975) entraînerait un appauvrissement de l'alimentation en protides et en lipides, nécessaires au bon développement du couvain. Toutes ces données justifient nos observations sur l'effet de la cyperméthrine sur le couvain (œufs et larves) et par conséquent sur la surface alvéolaire.

Mais si les études sur la toxicologie larvaire se développent de plus en plus (REMBOLD & CZOPPELT, 1982, CZOPPELT & REMBOLD, 1985) celles sur l'accumulation des insecticides et leur action sur les œufs restent faibles. Pourtant l'action des pyréthrinoïdes ne peut être que plus forte sur les œufs, puisque les mécanismes enzymatiques de détoxification ne sont déclenchés qu'à partir du stade larvaire (CZOPPELT & REMBOLD., 1985). De plus les protéines et lipides étant affectés par les pyréthrinoïdes (BOUNIAS, 1985a, M'DIAYE & BOUNIAS, 1993), un appauvrissement du vitellus des œufs au cours de sa formation chez la reine n'est pas exclu. La cyperméthrine agirait probablement en inhibant des régulateurs de croissance (Ecdysone et hormone juvénile) qui seraient impliqués dans l'éclosion des œufs (HERBERT *et al.*, 1986). Le stade larvaire est donc beaucoup plus vulnérable chez l'abeille mellifère (DAVIS *et al.*, 1988)aux agressions des insecticides, pouvant aller jusqu'à l'affaiblissement total du cheptel apicole.

## **2. 5-Problème posé par l'acceptation des reines**

Au cours de nos travaux, nous avons été confronté au problème de l'acceptation des reines par des essaims orphelins. Une large recherche a été effectuée par SZABO & TOWNSEND (1974), SZABO (1974), CURRIE & JA (1980), FREE *et al* (1990), sur les problèmes posés par l'introduction des reines. Un phénomène qui reste jusqu'à présent mal

élucidé. Nous avons noté que seulement 21 ruches, sur les 40 au départ, ont accepté la reine, soit 51%. RAJASHAKARAPA (1979) attire l'attention sur ce même phénomène mais sur *Apis cerana* en précisant que souvent les abeilles orphelines refusent même de toucher la reine introduite. De leur côté CHAUVIN (1960), SZABO (1974), FERGUSSON & FREE (1980), montrent que la communication entre la reine et les abeilles est phéromonale. Le contact se fait d'abord entre la reine et le "cortège" des abeilles accompagnatrices, qui transmettent l'information ensuite au reste de la population par simple contact en chaîne. Il se pourrait que lors de l'émergence de la reine de sa cage de transport, sa reconnaissance par la population demande un temps de latence, un délai (qui serait intéressant à étudier) nécessaire pour que l'information puisse passer de la reine au reste de la population, afin que toute la ruche s'imprègne de l'odeur de la nouvelle reine. L'âge des abeilles est un autre facteur qui semble entrer en jeu dans l'acceptation des reines. En effet PERSHAD (1966) et SZABO (1974) concluent à la fin de leur travaux que les jeunes abeilles, âgées de moins de 7 jours, accepteraient plus facilement une nouvelle reine, que des abeilles âgées de 14 à 21 jours. Selon PHAM *et al.* (1982, 1993) le système olfactif des abeilles est rudimentaire chez les plus jeunes de 1 à 6 jours: autrement dit, à cet âge les jeunes abeilles ont suffisamment de temps pour s'adapter à la nouvelle phéromone royale l'*acide céto-9-décène-2transoïque* identifiée par BARBIER & LEDERER (1960). Par contre les abeilles âgées de plus de 6 jours auraient des difficultés à accepter une nouvelle reine: les abeilles à cet âge ont probablement déjà fixé l'empreinte chimique phéromonale de leur reine d'origine, et ainsi il devient très difficile de remplacer cette empreinte par une autre. Donc l'introduction d'une nouvelle reine dans un groupe d'abeilles âgé paraît être une tâche qui présente peu de succès.

La maturité sexuelle de la reine est un facteur qui a son importance. YAVADA & SMITH (1971) estiment que les abeilles acceptent plus facilement une reine vierge, et l'attraction diminuerait avec l'âge des reines. (BUTTLER & SIMPSON, 1971 ; FREE *et al.*,

1990) signalent que les abeilles orphelines préféreraient une jeune reine qui s'est développée au sein même de la colonie. Nous avons aussi remarqué que souvent, par besoin, une population peut accepter une reine étrangère à la ruche, mais dès qu'une nouvelle reine émerge, la reine mère est rejetée. Les ouvrières sembleraient donc plus sensibles à la présence d'une reine qu'elles ont elles même élevée. Ce phénomène semble s'amplifier en présence de la cyperméthrine qui provoque une modification du comportement collectif.

Trois facteurs primordiaux semblent agir sur l'acceptation des reines par des abeilles orphelines.

$\alpha$ -La phéromone attractive de la reine qui aurait son origine dans les glandes mandibulaires et sous cutanées (WELTHUIS, 1972 ; BUTLER & SIMPSON, 1971 ; FERGUSON & FREE, 1980). La diminution de la phéromone royale en qualité ou en quantité peut avoir un effet inverse sur le développement des glandes mandibulaires des ouvrières (GARY, 1961 ; COSTA-LEONARDO, 1985).

$\beta$ -L'âge des nuclei (paquets d'abeilles orphelines), puisqu'en absence de reine, les ouvrières ont tendance à développer leurs propres gonades et à pondre.

$\gamma$ -L'âge et L'état des reines introduites vierges ou déjà fécondées. Il convient d'en ajouter au moins deux autres, à savoir:

$\gamma_1$ -Le délai nécessaire pour que la ruche soit imprégnée de la phéromone émanant de la nouvelle reine introduite.

$\gamma_2$ -La race de la reine, qui aurait peut être son effet sur le taux d'acceptation ?

Il est probable que la cyperméthrine fasse intervenir la phéromone indirectement en agissant sur les glandes mandibulaires de la reine (BEETSMA *et al.*, 1975). En les atrophiant, le pesticide provoquerait une déficience en quantité et qualité de cette

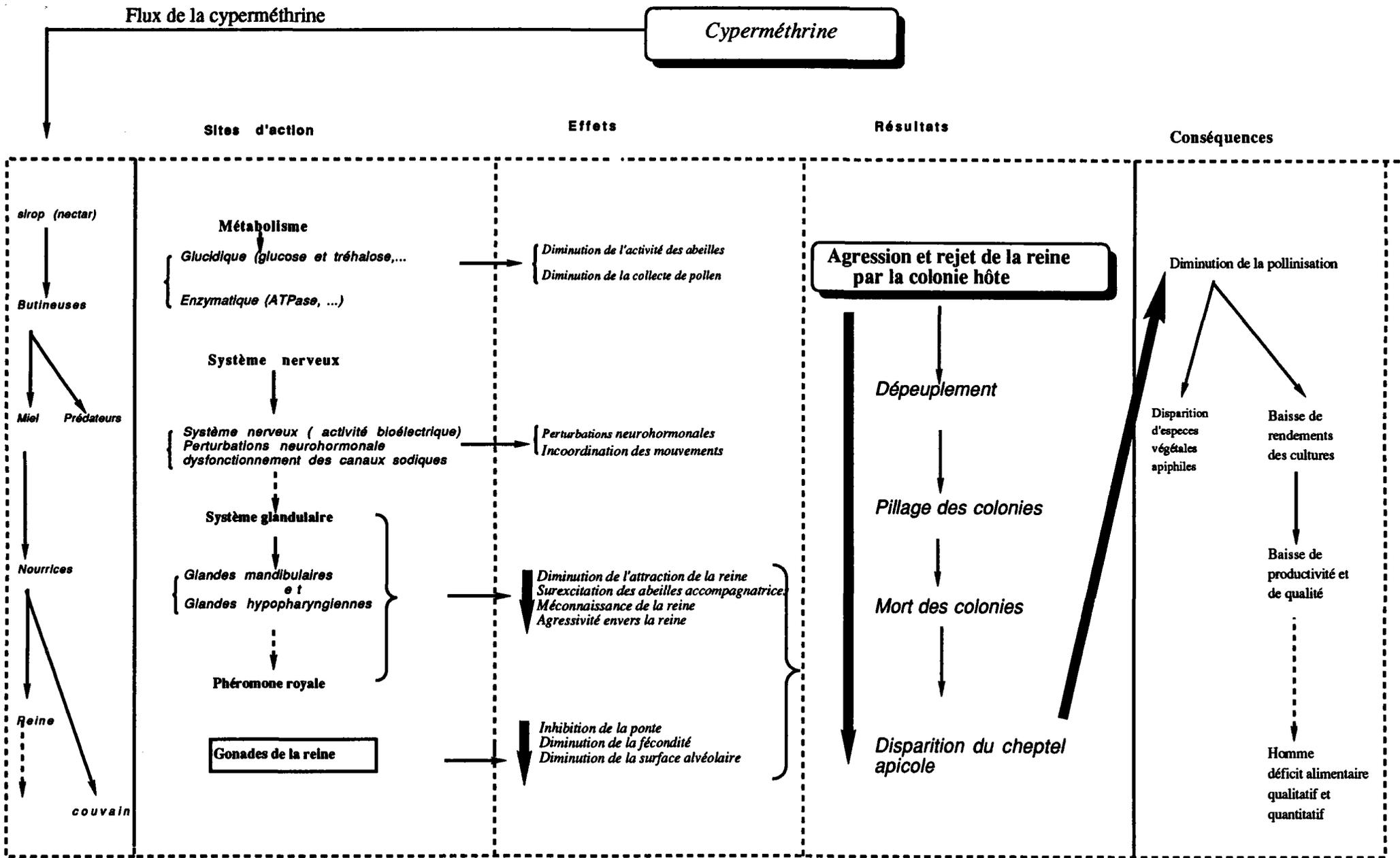
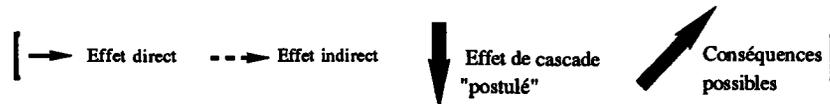


Figure. 50: Schéma général de la circulation de la cyperméthrine dans le cadre du présent essai, à l'intérieur des colonies et des dégâts possibles en cas d'intoxication chronique.



phéromone d'où diminution des signaux de reconnaissance (cela serait intéressant à vérifier dans des travaux ultérieurs) ce qui pourrait induire une recrudescence de l'agressivité des ouvrières envers la reine, suivie souvent, par son rejet hors de la colonie. Il est évident que la vie en groupe ou société, modifie la physiologie des individus. Il est par ailleurs possible d'établir des liens de causes à effet, car la population est contrôlée par une phéromone qui agit sur les abeilles et provoque des modifications d'ordre physiologique et comportemental. La figure 50 résume les différentes altérations susceptibles d'être provoquées par la cyperméthrine et les conséquences que subit un cheptel apicole en fin de chaîne.

## **2. 6-Comparaison avec la situation réelle en champs**

Une des premières lacunes des tests au laboratoire est qu'ils se limitent à l'observation d'abeilles isolées. Or, seule la colonie d'abeilles forme une unité ; qu'il s'agisse donc de la destruction de quelques butineuses ou de la majorité des abeilles d'une ruche, le dommage constitue une atteinte à l'ensemble de la société (DOUTT, 1959). Ainsi, si un certain nombre d'abeilles meurt par intoxication aiguë, les autres peuvent ramener à la ruche des toxiques qui empoisonnent le couvain et les ouvrières (MOFFET *et al.*, 1972). En outre si la mortalité n'est pas soudaine et en l'absence d'hécatombes, les perturbations métaboliques enregistrées au cours de l'essai sous l'effet de la cyperméthrine aussi bien au laboratoire que sur le terrain, montrent bien les préjudices que subissent les abeilles, ce qui à long terme (5 mois) entraîne la disparition de la quasi totalité du lot traité. Il est donc compréhensible que les abeilles puissent s'empoisonner peu à peu à l'intérieur de la ruche, d'autant plus qu'elles ne sont plus en groupe restreint à l'intérieur d'une cagette, mais dans une société où beaucoup d'autres facteurs viennent amplifier l'effet de l'insecticide, comme cela a été détaillé dans les chapitres précédents. De plus dans les essais de laboratoire se trouvent réunies les meilleures conditions pour que les abeilles atteintes par l'intoxication parviennent à surmonter

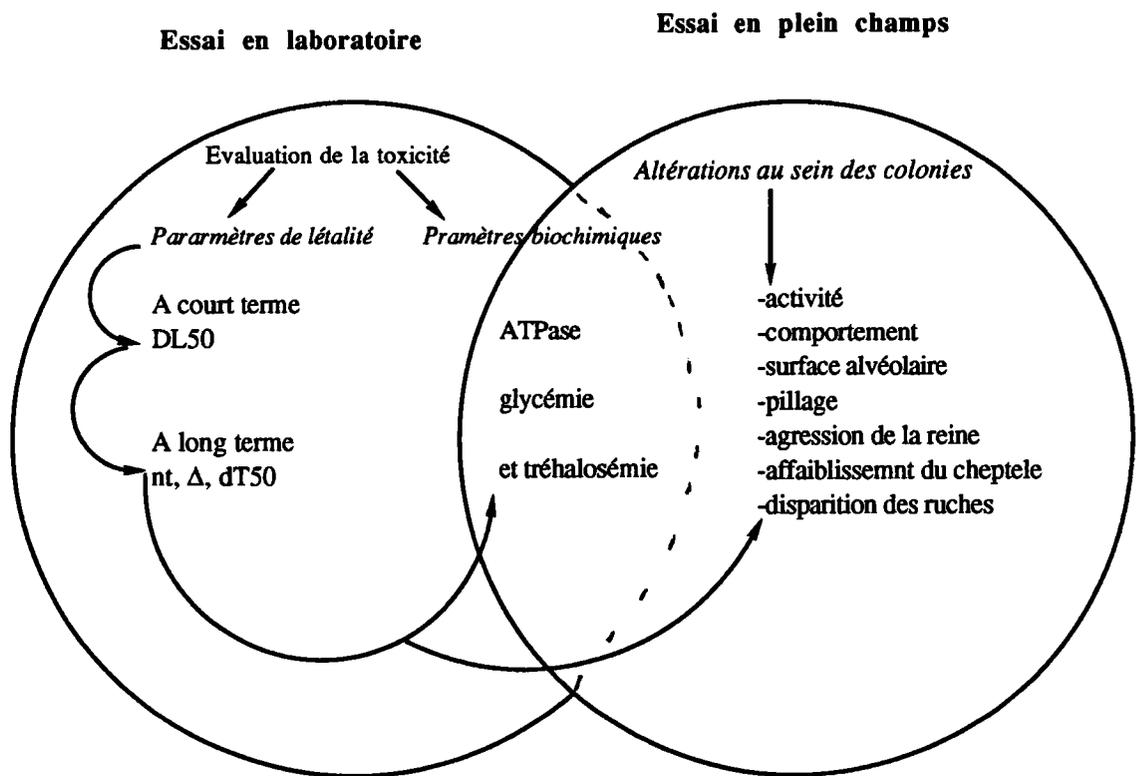
éventuellement leur handicaps puisqu'elles ont du sirop de saccharose et de l'eau à disposition, alors que dans la nature elles sont soumises aux agressions extérieures et peuvent se traîner sur le sol jusqu'à épuiser leur réserves sans pouvoir gagner leur ruches. Les tests au laboratoire annoncent par défaut le risque et sous estiment beaucoup de facteurs externes. En effet on peut penser que les abeilles ne butinent les fleurs traitées que quelques jours après pulvérisations, il est cependant prouvé que les pollens contaminés par les insecticides, notamment, peuvent rester toxiques 8 mois dans la ruche (JOHANSEN, 1977). Comme on l'a déjà souligné, l'action d'un pesticide ne se traduit pas uniquement par la mortalité des individus, mais également par des effets à long terme qui peuvent se manifester, tel que l'agression de la reine, perturbation du comportement et le pillage qui provoquent des dommages assez sérieux aux colonies. Les effets pernicieux cumulatifs des doses ingérées se manifestent par une mortalité dans toutes les classes d'âges et par un amoindrissement du cheptel apicole à long terme. Il semble donc très difficile d'extrapoler des tests de laboratoire à la réalité du terrain, et rien ne remplacera l'expérience réelle sur le terrain. Réciproquement, les essais de laboratoire devraient permettre de comprendre les mécanismes particuliers qui interviennent dans le résultat final observé sur le terrain.

## **2. 7-Estimation du Risque**

Nous sommes en présence d'un insecticide "la cyperméthrine" dont nous connaissons les effets à long terme et à grande échelle, non seulement sur les colonies entières, mais sur plusieurs paramètres biochimiques. Or pour cet même insecticide nous disposons d'essais à court terme au laboratoire, portants d'une part, sur les mêmes paramètres biochimiques (glucides et ATPase), et d'autre part, sur des paramètres de mortalité. La question est donc: dans quelle mesure les essais au laboratoire se répercutent-ils sur ceux du terrain ? que peut on conclure en terme de "RISQUE" ou de prédiction d'effets que peuvent entraîner des doses définies de cyperméthrine au

laboratoire, lorsqu'on passe sur le terrain ?.

La première approche au laboratoire nous a permis d'établir, d'abord, les relations doses-mortalités qui ont abouti à la détermination de nouveaux paramètres de létalité ( $nt$ ,  $\Delta$  et  $dT50$ ) en plus de la  $DL50$ , calculés lors d'un nourrissage continu à la cyperméthrine. Ces derniers se sont avérés révélateurs d'une toxicité chronique: or cette chronicité constitue un des aspects les plus importants de cette étude toxicologique ; car elle permet d'expliquer les dégâts que provoqueraient une intoxication similaire qui se passerait sur le terrain suite à une accumulation dans le miel d'insecticide qui ne serait pas au premier abord mortel pour la colonie, tandis qu'un nourrissage continu étalé sur plusieurs mois pourrait avoir de graves conséquences suite à l'effet cumulatif dans l'organisme. Cela a été le cas, pour la cyperméthrine, dans le cadre de notre essai. Ensuite les paramètres biochimiques pour ce même insecticide ont montré au laboratoire et sur le terrain jusqu'à la semaine 12 un état permanent de déficit en énergie estimé par l'hypoglycémie et l'hypotrèhalosémie. Il est probable que cette modification dans la glycémie et la trèhalosémie enregistrée au laboratoire selon une cinétique de 3 heures, reflète une perturbation temporaire due au métabolisme du toxique, au delà de laquelle il intervient une récupération de certaines facultés du métabolisme glucidique. Néanmoins le glucose reste quand même un test précoce non dépourvue de signal à plus long terme, en tant que signe d'un déficit en ATP. D'autre part, les mesures sur le terrain ont été effectuées à partir de prélèvements d'abeilles actives: or, un déficit d'ATP est encore décelable si la glycémie n'a pas encore été abaissé au dessous d'un seuil critique. En revanche, dès que le déficit glycémique dépasse ce seuil, sans possibilité de restauration par le glycogène produit en présence d'ATP, les abeilles cessent de travailler et échappent même aux prélèvements pour analyse. Il serait intéressant d'effectuer ces analyses sur des animaux présentant des signes d'affaiblissement graves. Mais là encore, il se présente un obstacle: celui du volume d'hémolymphe. Il serait donc indispensable d'abréver



**Figure 51:** Différentes étapes reliant l'essai en laboratoire avec l'essai sur le terrain

les animaux dans des conditions définies, de manière à rétablir un volume d'hémolymphe normal, ne faussant pas l'expression des concentrations mesurées. Quant à l'activité ATPasique, il y a une parfaite concordance entre les effets provoqués au laboratoire et sur le terrain par la cyperméthrine sur cette enzyme. Ce test présenterait, par ailleurs, l'avantage de compléter l'analyse des paramètres de létalité calculés au laboratoire, en précisant les traumatismes biochimiques que subissent les abeilles succombant ou résistant aux intoxications. L'extrapolation des résultats de laboratoire au terrain, est une étape très difficile à opérer, mais indispensable pour estimer le risque encouru par les abeilles dans la pratique. Néanmoins on peut noter que la baisse de glycémie et de l'activité ATPasique à long terme sont assez bien liées à la surface alvéolaire, ces correspondances pourraient faire partie des prédictions éventuelles. Donc la certitude de la toxicité de la cyperméthrine sur les abeilles au laboratoire, a constitué une présomption des effets à long terme dans les conditions de notre essai, non plus sur un groupe restreint d'abeilles, mais sur toute la colonie. Le risque d'intoxication au laboratoire en complément d'autres techniques d'investigation comme les nouveaux paramètres de létalité, nous permettraient d'évaluer les risques d'intoxication par un produit avec une meilleure fiabilité. La figure 51 résume les étapes liants les essais au laboratoire avec ceux effectués sur le terrain.

**CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

De ce travail nous pouvons retenir que les abeilles subissent les effets de la cyperméthrine et du fénitrothion. En ce qui concerne l'évaluation de leur toxicité, la cyperméthrine et le fénitrothion sont effectivement hautement toxiques pour les abeilles. L'emploi de ces deux insecticides en pleine floraison pourrait sans aucun doute porter préjudice aux colonies d'abeilles. Face aux critiques de plus en plus nombreuses sur la notion de la DL50, Il est également intéressant de retenir que les nouveaux concepts toxicologiques abordés ici, sont importants, car ils permettent l'étude toxicologique d'un produit sous un angle différent. Les paramètres que nous proposons tiennent compte de l'aspect chronique, ou des conséquences susceptibles de ne se manifester qu'à long terme, contrairement à la DL50. Toutefois, des améliorations sont à apporter quant au maintien des abeilles en captivité, où plusieurs facteurs semblent poser des problèmes sur leur survie en cagettes, tels: L'isolement, l'alimentation, l'absence de reine, les difficultés d'excrétion et une incapacité au vol. La toxicité aiguë s'intéresse à la notion de vie ou de mort de l'abeille durant un temps fixé au préalable (24, 48 ou 72 heures), cependant l'abeille peut subir des perturbations biochimiques au contact des insecticides sans pour autant succomber. La cryptotoxicité, qui se base sur l'étude de certains composés hémolympatiques (glycémie) d'une part, et de l'activité de certaines enzymes (ATPase, AChE) d'autre part, peuvent révéler les perturbations qui surviennent lors d'une intoxication sans qu'il y ait pour autant mort immédiate. La cyperméthrine et le fénitrothion agissent d'une manière significative sur le métabolisme glucidique. Le glucose et tréhalose dans l'hémolymphe subissent une chute brutale qui peut se révéler dangereuse par la liaison directe qui existe entre glucides et fourniture d'énergie (ATP), autant pour l'abeille en tant qu'individu que pour toute la population. L'étude de l'action de la cyperméthrine sur l'ATPase a montré effectivement une inhibition responsable de la diminution d'énergie pour le bon déroulement des réactions biochimiques couplées à l'hydrolyse de l'ATP. L'acétylcholinestérase, utilisée comme

marqueur pour juger les traumatismes subis par l'insecte au contact des organophosphorés, montre une inhibition assez importante pour provoquer une diminution de motilité, liée à une perturbation dans la transmission nerveuse. La cyperméthrine, introduite à des doses sublétales dans des colonies d'abeilles, entraîne des modifications biochimiques qui inhibent le métabolisme énergétique et protidique, se répercutant sur l'activité globale de la ruche. Ceci se manifeste, en effet, par des altérations observées au niveau de la surface du couvain et de la fécondité de la reine, tandis que les relations abeilles/reine sont également affectées à long terme par une dose sublétale de cyperméthrine.

#### ➔ **Quelques voies ouvertes à de futures investigations**

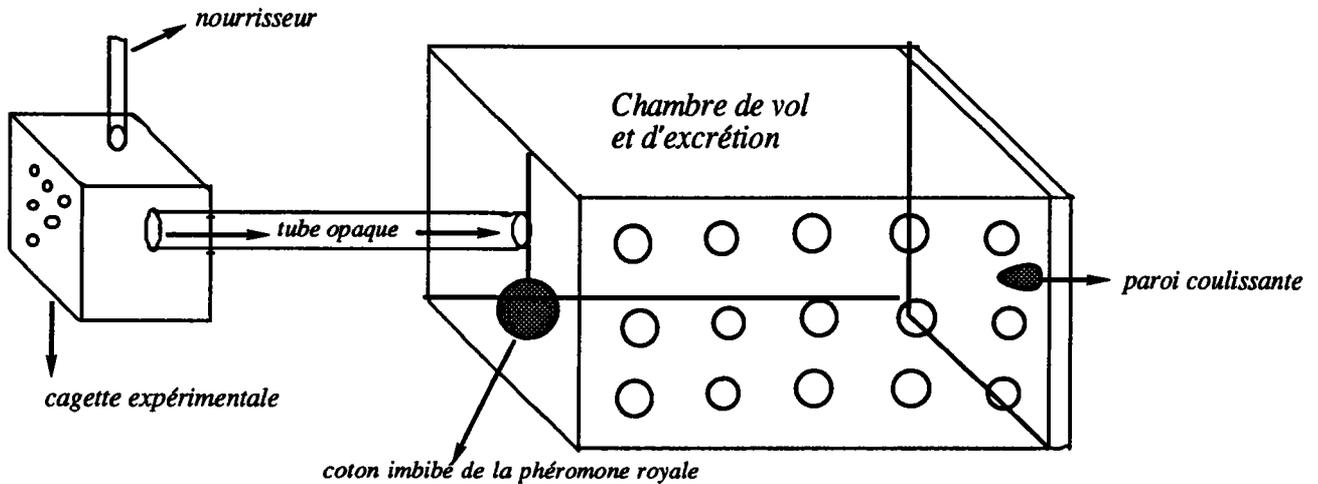
Il serait intéressant d'approfondir certains résultats, comme perspectives de recherches pouvant faire suite à ces travaux, et notamment étudier d'une façon plus détaillée l'effet conjoint de la cyperméthrine et du virus de la maladie noire ou d'une autre pathologie bien connue. Par un marquage radio-isotopique, ensuite, essayer de suivre la pénétration de la cyperméthrine et du virus à l'intérieur de l'abeille, afin de déceler les sites et le mode d'action, aussi bien différentiels que commun pour enfin donner une explication, et confirmer s'il y a effectivement synergie ou un simple effet additif des deux toxicités. Ce sujet a été pris en considération par le laboratoire et des études sur l'effet conjoint entre le lindane et le virus de la maladie noire ont déjà été lancées.

Les futures recherches devraient aussi porter sur le problème de l'acceptation des reines. Il serait intéressant d'étudier l'introduction des reines étrangères non pas directement dans les ruches, mais plutôt dans un insectarium où se trouveraient seulement des cadres à couvain, de manière à ce que les abeilles naissantes qui n'aient pas encore fixé l'empreinte chimique phéromonale d'une reine, soient directement en contact avec la nouvelle reine. Le pourcentage d'acceptation serait certainement plus important.

De ces recherches il découle la nécessité d'apporter quelques modifications quant à l'étude de la toxicité sur les abeilles. Les lots de 30 abeilles par cagette ne compensent qu'imparfaitement la perturbation de l'effet de groupe, que subissent les abeilles, sans oublier la reine et ses effets sur l'équilibre de la population. Il serait intéressant d'étudier la toxicité en l'absence et en présence de la phéromone royale synthétique afin d'évaluer l'incidence qu'elle pourrait avoir sur l'équilibre d'une population restreinte en cagette.

En outre, dès que le test dépasse 24 heures, le problème de la défécation s'installe. En effet, dans les conditions normales, les abeilles sont obligées de sortir de la ruche et de déféquer en vol. En captivité, elles se privent d'excréter, leur abdomen gonfle et leur alimentation diminue. Ceci joue sans aucun doute un rôle sur la toxicité de l'insecticide, puisqu'une auto-intoxication vient s'y greffer. C'est pour cela qu'aujourd'hui nous proposons deux méthodes d'évaluation de la toxicité, (en vue de l'homologation des produits phytosanitaires): la première au laboratoire et l'autre sur le terrain. Celle du laboratoire pourra s'ajouter la DL50, par de nouveaux paramètres toxicologiques en subchronique ( $dT_{50}$ ,  $nt$ , et éventuellement  $\Delta$ ) qui se baseront sur toute la vie de l'abeille, mais avant tout les recherches devraient s'orienter vers l'élaboration d'un nouveau système de cagettes qui permettrait de pallier les contraintes que nous venons de citer, puisque. Il paraîtrait opportun d'envisager un système de cagettes expérimentales munies d'une chambre de vol d'excrétion (Fig. 52), surtout pour des tests dépassants les 72 heures.

On pourrait aussi pallier l'effet de groupe et l'effet reine qui font défaut dans les essais en cagettes, par un système de "microsociété". En résumé: au lieu de se limiter à des cagettes de 30 abeilles chacune, il serait plus intéressant d'entreprendre les tests au laboratoire dans une enceinte close, avec une aire de vol. Cette procédure ne ferait plus appel à des cagettes mais utiliserait des ruchettes au sein desquelles les effets de beaucoup de facteurs biologiquement préjudiciables seront atténués.



**Figure 52:** Prototype de cagette avec chambre de vol et d'excrétion

La toxicité au laboratoire devra se compléter par le test en plein champs comme nous l'avons présenté le long de cette thèse. Ce test prendra en compte d'un côté, l'aspect cryptotoxicologique essentiellement biochimique traduisant l'état interne physiologique, et d'un autre côté, l'évolution générale des colonies d'abeilles basée sur l'étude de la fécondité de la reine, la surface alvéolaire et enfin l'activité des abeilles. En dépit de la lenteur et des efforts que cette méthode requiert, les informations ainsi fournies la rendent précieuse et prometteuse.

Enfin, au terme de ces recherches il nous paraît capital de signaler que les tests de toxicité chronique devraient être axés sur les perturbations que peuvent induire les insecticides sur la reine et sa fécondité. En effet, la dépopulation des colonies en absence d'accidents graves qui seraient dûs à une mauvaise manipulation des pesticides ou au non respect des normes établies par la commission d'homologation, reste l'intoxication progressive de la reine. Il est vrai que les ouvrières sont aussi en

contact avec les insecticides, mais souvent à une dose tellement infime qu'on ne peut suivre son effet au delà de 40 jours (âge moyen des abeilles de printemps), alors que l'âge moyen d'une reine se situe entre 4 et 5 ans. C'est au niveau de la reine et de sa progéniture que devraient s'orienter les recherches sur les effets à long terme des insecticides, puisqu'elle est la seule à subir un effet cumulatif en cas d'intoxication chronique aux insecticides.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- ALEXANDROV I. S., L. N. DALINOV**, 1975, Sur les qualités bactéricides de la propolis, In "propolis", *Apimondia. Ed*, Bucarest, 41-42.
- ANDERSON J. F., M. A. WOJTAS**, 1986, Honeybees (*Hymenoptera: Apidae*) contamination with pesticides and polychlorinated biphenyls, *J. Econ. Entomol.*, 79, 1200-1205.
- ANJUN F., S. H. SYED**, 1986, In vivo metabolism of fenitrothion in fish water teleost (*Tilapia mossambica*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 745-750.
- ARNOLD G.**, 1970, L'influence de l'isolement des abeilles sur la consommation alimentaire, *Apidologie*, 10, (1), 29-34.
- ASHELISHA A. D., S. SIVAKUMAR**, 1989, The kinetics of methylparathion and fenvalerate action and  $\text{Ca}^{2+}$  antagonism on the activity of ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) ATPase in sorgum (*Sorgum bicolor L.*), *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34, 118-125.
- ASSOCIATE COMMITTEE ON SCIENTIFIC CRITERIA FOR ENVIRONMENTAL QUALITY**, 1981, Pesticide pollinator interaction, 194 p.
- ATKINS E. L., D. KELLUM, K. W. ATKINS**, 1981, Reducing pesticide hazardous to honeybees. Mortality prediction techniques and integrated management strategies, *Berkley Ed*, University of California, 23p.
- ATKINS E. L., D. KELLUM**, 1986, Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood, *J. Apic. Res.*, 24, (4), 245-255.
- BACHMAN W., W. D. GORDON**, 1977, Honeybee responses to sugar solutions of different compositions, *J. Apic. Res.*, 4, (16), 165-169.
- BARBIER M., E. LEDERER**, 1960, Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille (*Apis mellifera*), *C. R. Acad. Sci.*, 250, 4466-4469.
- BARBIER E.**, 1986, La pollinisation des cultures, pourquoi, comment ? *E. Barbier. Ed.*, 477p.
- BARKER R. J., G. D. WALLER**, 1978, Sublethal effects of parathion, methyl parathion, or formulated methoprene fed to colonies of honeybees, *Environ. Entomol.*, 7, 569-571.
- BARKER R. J., Y. LEHNER, M. R. KUNZMAN**, 1980, Pesticides and honeybees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethaote, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 125-133.

- BEETSMA J., A. HOUTEN, A. TEN**, 1975, Effect of juvenile hormone analogues in the food of honeybee colonies (*Apis mellifera*), *Zeits. Ang. Entomol.*, 77, 292-300.
- BELZUNCES L. P., J. P. TOUTANT, M. BOUNIAS**, 1988, Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head, *Biochem. J.*, 255, 463-470.
- BENZ G.**, 1971, Synergism of microorganisms and chemical insecticides, microbial control of insects and mites, *H.D Burgs and N.W Hessey. Eds.*, 327-355.
- BHAGYALAKSHMI P., P. SREENVASVAL**, 1984, In vivo subacute physiological stress induced by sumithion on some aspect of oxidative metabolism in the fish water and crab, *Water Air and Soil Pollution*, 23, 257-262.
- BOMAN H. G.**, 1989, Insect responses to microbial infections in microbial control of pests and plant diseases, *H.D. Burges (Ed)*, 769-784.
- BORNECK R.**, 1987, Rôle et protection des abeilles, *La défense des végétaux*, 243-347.
- BORNECK R., B. MERLE**, 1989, Essai d'une évaluation de l'incidence économique de l'abeille pollinisatrice dans l'agriculture européenne, *Api. Acta.*, 24, 33-38.
- BOS C., C. MASSON**, 1983, Analyse des effets, en particulier la répulsivité d'un pyrèthrianoïde de synthèse, la deltaméthrine, sur les abeilles, *Rev. Agro.*, 6, 545-553.
- BOUNIAS M.**, 1976, Microanalyse quantitative par nanochromatographie sur couche mince de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes.I: les glucides libres, *Analisis*, 10, (1), 31-35.
- BOUNIAS M., H. PACHECO**, 1979a, Sensibilité de la glycémie de l'abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo, *C.R. Soc. Biol.*, 182, 37-43.
- BOUNIAS M., H. PACHECO**, 1979b, Effet hyperglycémiant de l'adrénaline injectée chez l'abeille in vivo, *C.R. Acad.Sci.*, D289, 33-36.
- BOUNIAS M.**, 1980a, In vivo control of haemolymph  $\alpha$ -glucosidase kinetics by glycemia components, according to development stages of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Insecta), *Comp. Biochem. Physiol.*, 66B, 335-341.
- BOUNIAS M.**, 1980b, N-(1-naphtyl)ethylenediammonium dichloride as a new reagent for nanoquantification of glucids on thin layer by mathematical calibration process, *Analyt. Biochem.*, 106, 291-295.

- BOUNIAS M.**, 1983, L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince, *MASSON Ed, Paris*, 198p.
- BOUNIAS M.**, 1985, Corrélation fonctionnelle gluco-lipidique dans l'hémolymphe d'abeilles soumises au jeûne, *C. R. Acad. Sci.*, série III, 9, 381-384.
- BOUNIAS M., N. DUJIN, D. S. POPESKOVIC**, 1985a, Sublethal effects of synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the Glycemia, lypemia, and the gut alkaline phosphatase of honeybees, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 24, 149-160.
- BOUNIAS M., N. DUJIN, D. S. POPESKOVIC**, 1985b, A comparison of heamolymph lipid classes at different stages of the honeybee development. *Acta Veterinaria.*, 35, 273-282.
- BOUNIAS M.**, 1986, Analogie de deux effecteurs hyperglycémisants: l'AMPc et le glucagon injectés chez l'abeille in vivo, *C. R. Acad. Sci. Serie III.*, 302, (5), 141-144.
- BOUNIAS M.**, 1987, Propanol and somatostatin interactions with the hyperglycemic effects of glucagon, octapamine, noradrenaline and cAMP in worker honeybees in vivo, *Soc. Chem. Biol.*, 69, 655-660.
- BOUNIAS M., R. J. MORGAN**, 1987, The yearly honey productivity of hives as correlated to the glycemia of emerging working bee, *Indian. J. Agric. Chem.*, 19, (3), 156-160.
- BOUNIAS M.**, 1989, Derivation of actual toxicological constants in lethality studies, *Biomath.*, 107, 29-45.
- BOUNIAS M.**, 1990, Définition algébrique de constantes toxicologiques caractéristiques de létalité, *C. R. Acad. Sci. Paris.*, Série III, 65-70.
- BRATTSTEN P.**, 1990, Resistance to carbamates and organophosphorus, *Am. Chem. Soc.*, chap3, 42-57.
- BURT P. E., R. E. GOODCHILD**, 1971, The site of action of pyrethrin in the nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*, *Entomol. Exp. App.*, 14, 179-189.
- BUTLER C. G., J. SIMPSON**, 1971, The mainting behaviour of the honeybes, *J. Entomol.*, 46, 1-11.
- BYRDY S., R. MIGULA, J. HENRY, A. DZIORSKI**, 1989, Intoxication of the worker honeybees (*Apis mellifera*) with pyrethroids., *Water. Res.*, 127, 257-268.

- CAMOUGIS G., W. M. DAVIS,** 1971, A comparative study of the neuropharmacological basis of action of pyrethrin, *Pyrethrum. Pest.*, 11, 17-14.
- CARLE P. R.,** 1985, Mode d'action et utilisation des pyréthrinoïdes, communication au colloque "Insect-insecticides-santé", novembre, Angers.
- CASCINO P., M. NECTOUX., G. GUIRAUD, M. BOUNIAS,** 1989, The formamidine amitraz as a hyperglycemic agonist in worker honeybees (*Apis mellifera*) in vivo, *Biochem. Environ. Sci.*, 2, 106-114.
- CAZANEVE A., Ph. DEBRAYE, M. ESTUELLE,** 1980, Etude du comportement d'abeilles (*Apis mellifera*) sur des plantes en fleurs traitées avec le fenvalerate, *Phytiatrie. Phytophar.*, 29, 93-106.
- CHANDRASHEKAR R.,** 1979, Effects of insecticides on the activities of digestive amylase and protease of honeybee (*Apis cerana indica*). *Indian. Bee. J.*, 41, 9-11.
- CHANTER D. O., R. HEYWOOD.,** 1982, The LD50 test, some considerations of precision, *Toxicol. letters.*, 10, 303-307.
- CHARLES P. M. J.,** 1985, An estimate of the heritability of longevity of length of life in the honeybee, *J. Apic. Res.*, 3, (24), 137-139.
- CHAUVIN R.,** 1956, Les facteurs de la ponte chez la reine d'abeille, *Insect. Soc.*, 3, 499-504.
- CHAUVIN R.,** 1960, Les substances actives sur le comportement à l'intérieur de la ruche, *Ann. Abeille.*, 3, 185-195.
- CHAUVIN R.,** 1968, Traité de biologie de l'abeille, *Masson Ed*, tome 1, 500p.
- CHENG E. Y., L. K. CUTKOMP,** 1972, Agency in honeybee, *Apis mellifera*, as related to brain ATPase and DDT sensitivity, *J. Insect. Physiol.*, 18, 2285-2291.
- CHRISTENSEN E. R.,** 1984, Dose response functions in aquatic toxicity testing and the weibull model. *Water. Res.*, 18, 213-221.
- CLARK J. M., F. MATSUMURA,** 1982, Two types of inhibitor effects of pyrethroids on nerve calcium ATPase and calcium and magnesium activity in the squid, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18, 2 180-190.
- CLINCH P. G., D. PALLMER, I. W. FORSTER,** 1973, Effect on honeybees of dictophos and methomyl applied as spray to white clover, *N.Z.L. Exper. Agric.*, 1, 97-99.

- COLIN E.**, 1981, Etude du pouvoir bactériostatique de la propolis., *Rev. Fr. Apic.*, 81, 47-49.
- COLIN M. E., M. D. GONZALEZ**, 1986, Traitement de la varroatose de l'abeille domestique, chimiothérapie, mesures adjuvantes et perspectives de lutte biologique, *Res. Sc.Th.Off.Int.Epizo.*,5, 677-687.
- COMMISSION DES ESSAIS BIOLOGIQUES**, 1982, Méthodes d'essai destinées à connaître les effets des insecticides sur l'abeille domestique (*Apis mellifica L.*), *Soc. Phytatrie. Phytopharm.*, 95, 1-19.
- COSTA-LEONARDO A. M., C. CRUS-LANDIM**, 1983, Longevity of *Apis mellifera* workers maintained under artificial conditions, *Rev. Braz.*, VI, 2, 353-356.
- COSTA-LEONARDO A. M.**, 1985, Developpement of cycle of mandibulaire glands of *Apis mellifera* workers, 2. Effect of Queenless, *J. Apic. Res.*, 24, 76-79
- COURTOIS G., J. LECOMTE**, 1958, Sur un procédé de marquage des abeilles butineuses au moyen d'un radioisotope, *C. R. Acad. Sci.*, (Paris), 247, 147-149.
- COURTOIS G., J. LECOMTE**, 1961, Etude des échanges de nourriture à l'intérieur de la ruche entre les abeilles ouvrières, *Apis mellifera L.*, *C. R. Acad. Sci.*, (Paris),
- COX R. L., T. W. WILSON**, 1984, Effect of permethrin on the behaviour of individually targed honeybees, (*Apis mellifera*), *Environ.Toxicol.*, 2, (13), 375-378.
- CRAILSCHEIM K.**, 1985, Distribution of haemolymph in the Honeybee (*Apis mellifera L.*) in relation to season, age and temperature, *J. Insect. Physiol.*, 31, 707-713.
- CRAILSCHEIM K.**, 1986, Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifera carnica*), *J. Insect. Physiol.*, 32, 629-634.
- CURRIE R. W., S. C. JA**, 1980, The influence of colony's state, time of year, and drifting behaviour on the acceptance and longevity of adult drone honeybees (*Apis mellifera L.*), *J. Apic. Res.*, 27, (4), 219-226.
- CZOPPELT C., H. REMBOLD**, 1985, Effects of Parathion on honeybee larvæ reared in vitro, *Third symposium on the Harmonization of methods for testing toxicity of pesticides to bees.Rothmstad Experimental Station, England. March*, Appendix 10, 18-21.
- DAVID B.**, 1985, Synthetic pyrethroids and evaluation of their effects on non target organisme, *Pesticides*, 16, (4), 409-415.

- DAVIS A. R., R. W. SHUEL**, 1985, Invisible damage to honeybee colonies from pesticides. *Can. Bee.*, 12, 60-61.
- DAVIS A. R., R. W. SHUEL**, 1988, Distribution of  $^{14}\text{C}$ -labeled carbofuran and dimethoate in royal jelly, Queen larvae and nurse honeybees; *Apidologie*, 19, 37-50.
- DAVIS A. R., K. R. SALOMON, R. W. SHUEL**, 1988, laboratory studies of larval growth and development as affected by systemic insecticides at sublethal levels, *J. Apic.Res.*, 27, (3), 146-161.
- DELABIE J., B. CHRISTIAN, F. CAROLINE**, 1985a, Toxic and repellent effects of cypermethrin on the honeybee laboratory glasshouse, and field experiments, *Pesticides*, 16, 409-415.
- DELABIE J., C. BUS, C. FONTA**, 1985b, Toxic and effects of cypermethrin on the honeybee, *Pesticides*, 19, (1), 9-12.
- DELAPLANE K. S., J. R. HARBO**, 1987, Effect of queenlessness on worker survival honey gain and defense behaviour in honeybees., *J. Apic. Res.*, 26, (1), 37-42.
- DELVERT-SALEIRNO F.**, 1963, Etude au moyen de radioisotopes des échanges de nourritures entre reine, mâles et ouvrières d'*Apis mellifera*, *Ann. Abeille.*, 6, 201-227.
- DESAIAH D., L. K. CUTKOMP, E.V. VEA, R. B. KOCH**, 1975, The effect of three pyrethroids on ATPase of insect and fish, *Gen. Pharmacol.*, 6, 31-34.
- DOUAULT P., J. LOUVEAUX, J. THEURKAUFF, P. AZOEUF, J. PINTENA**, 1974, Etude du stockage des réserves par les abeilles au moyen d'un sirop de sucre marqué au  $^{141}\text{Ce}$ , *Apidologie*, 5, 107-126.
- DOUAULT P.**, 1989, l'élevage expérimental des abeilles en milieu clos, *Bull. Techn. Apic.*, 15-22.
- DOUTT R.**, 1959, The case of the trespassing bees, *Bull. Entom. Soc. Am.*, 5, 93-97.
- DOWNER. R. G. H.**, 1982, Effect of lindane (Hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American Cockroach, *Periplaneta americana L.*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 17, 89-94.
- DUNADIEU**, 1976, De l'utilisation du miel chez l'homme dans le cadre des thérapeutiques naturelles., *Rev. Fr. Apic.*, 348, 68-70.

- EISCHEN F. A., J. M. KULINCEVIC, W. C. ROTHENBULER**, 1982, length of life and dry weight of worker honeybees reared in colonies with different worker larva ratio, *J. Apic., Res.*, 21, 19-25.
- ELLIOT M., F. JANES**, 1984, Developpement of pyrethroids in agriculture, *Fitopath.*, 34, 11-14.
- ELLMAN G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES, R. M. FEATHERSTONE**, 1961, A new and rapid method colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
- FAUCON J. P., C. FLAMINI, M. E. COLIN**, 1986a, Evaluation de l'incidence de la deltaméthrine sur les problèmes de Cheptel apicole 1-Essai en laboratoire, *Rev. Fr. Apic.*, 450, 71-73.
- FAUCON J. P., C. FLAMINI, M. E. COLIN**, 1986b, Evaluation de l'incidence de la deltaméthrine sur les problèmes de Cheptel apicole 2-Essai en plein champs, *Rev. Fr. Apic.*, 450, 123-126.
- FERGUSON A. W., J. B. FREE**, 1980, Queen pheromon transfert within honeybee colonies, *Physiol. Entomol.*, 15, 359-366.
- FERGUSON F.**, 1989, Long term effects of systemic pesticides on honeybees Proceeding of the second australian and international *Bee Congress, Sufer's Paradles*,
- FINNEY D. J.**, 1971, Probits analysis, third edition, *Cambridge university press.*, 333p.
- FLAMINI C.**, 1986, Analyse de divers types de résidus en apiculture, *thèse*, Université de Nice, 100pp.
- FLECHE C., J. P. FAUCON, C. FLAMINI**, 1985, Enquête Ecopathologique, (*rapport interne*), LPPRA-CNEVA (Sophia-Antipolis), 24 p.
- FLECHE C.**, 1986, Pesticides et analyses toxicologiques, (*rapport interne*), *S.P.M.F.*, sept 1986, 11-20.
- FOSTER R. E., M. D. LEVIN**, 1967, F1 hybrid bee activity in seed fields, *J. Ariz. Acad.*, 4, 222-225.
- FREE J. B.**, 1980, Difference in food consumption of caged honeybees from different colonies, *J. Apic. Res.*, 2, (16), 112-114.
- FREE J. B., A.W. FERGUSSON, J. R. SIMPSON**, 1990, Queen discramination by honeybee workers (*Apis mellifera*), *Apidologie*, 2, (6), 493-500.

- FRESNAYE J., Y. LENSCKEY**, 1961, Méthodes d'appréciation des surfaces de couvain dans les colonies d'abeilles, *Ann. Abeille.*, 4, (4), 374-376.
- FRIES I., K. WIBRAN**, 1986, Effect on honeybee colonies following application of the pyrethroid cypermethrin and PP321, in following oiled rape, *J. Apic. Res.*, 266-269.
- GAMMON**, 1978, Nerval effects of allethrine on the free walking cockroach and investigation at 15 and 32°C, *Pestic. Sci.*, 9, 79-91.
- GARY N. E.**, 1961, Queen honeybee attractiveness as related to mandibular gland secretions, *Science*, 133, 1479-1480.
- GIAUFFRET A., J. DUTHOIT**, 1966a, Etude histologique du tissu nerveux de l'abeille atteinte de maladie noire., *Bull. Apic.*, 2, 221-228.
- GIAUFFRET A., J. DUTHOIT**, 1966b, Etude virologique de quelques cas de la Maladie noire de l'abeille en France, *Rev. Méd. Vét.*, septembre, 819-829.
- GIAUFFRET A., M. CAUCAT**, 1967, Etude histopathologique de la maladie noire de l'abeille, *Bull. Apic.*, 2, 134-144.
- GIAUFFRET A., J. DUTHOIT**, 1969, Etude de différentes souches virales isolées chez l'abeille adulte, *Bull. Apic*, 1, 13-22.
- GIAUFFRET A., M. LAMBERT**, 1972, diagnostic de la maladie noire de l'abeille, *Rech. Méd. Vét.*, juillet, 869-877.
- GILBERT M. D., C. F. WILKINSON**, 1974, Microsoma oxidases in the honeybee, *Apis mellifera L.*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 4, 56-66.
- GILLIAM M.**, 1973, Are yeasts present in adult worker honey bees as a consequence of stress ?, *Ann. Entomol. Soci. Am.*, 66, 1176-1189.
- HARAGASIM O., J. ZDAREK**, 1972, Action sur les abeilles de quelque substances analogues de l'hormone juvenile employées comme insecticides. Symposium of the international commission for bee botany, Stuttgart-Hohenheim, GFR. October, *Apidologie*, 4, 193-194.
- HARDY I., D. SKROBAL**, 1976, The effect of two juvenoids on honeybee colonies (*Apis mellifera*), *Apidologie*, 7, 39-47.
- HARIS C. R., S. A. TURNBULL**, 1978, Laboratory studies on the contact toxicity and activity in soil of four pyrethroids, *Can. Entomol.*, 110, 285-288.

- HAYDAK M. H., E. VIVINO**, 1943, Changes in vitamin content during life of the worker honeybee, *Arch. Biochem.*, 2, 201.
- HAZAN M., Y. LENSKY, P. CASSIER**, 1989, Effect of queen honeybee, ageing on her attractiveness to worker, *Comp. Biochem. Physiol.*, 93, (4), 777-783.
- HELLING H.**, 1984, Etude de la neurotoxicité de 3 pyréthrinoïdes chez deux espèces de Blattes, toxicité globale et effets sur l'activité électrique, *thèse*, Louvain, 106pp.
- HERBERT E. W., R. J. ARGAUER, H. SIUMANUKI**, 1986, The effect of an insect chitin synthesis inhibitor on honeybees, *Apidologie*, 17, 73-76.
- HERVE J.**, 1982, Le mode d'action des pyréthrinoïdes et le problème de la résistance à ces composés, deltaméthrine, monographie, *Roussel Uclaff*, Chap 3, 67-107.
- IBRAHIM N., T. E. ARCHER, E. NORMAN, J. MARSON**, 1974, Honeybee pesticide mortality, intoxication versus acetylcholinesterase concentration, *J. Apic. Res.*, 13, (1), 55-60.
- INTERNATIONAL COMMISSION FOR BEE BOTANY**, 1980, Symposium on the harmonisation of methods for testing the toxicity of pesticides to bees, Septembre, 23-25.
- JACQUES Y.**, 1980, Interaction of pyrethroids with Na<sup>+</sup> channel in mammalian neuronal cells in culture, *Biochem. Biophys.*, 600, 882-897.
- JOHANSEN C. A.**, 1977, Pesticides and Pollinators, *Ann. Rev. Entomol.*, 22, 177-180.
- JOHANSEN C. A., D. F. MAYER, J. D. EVES, C. W. KIOUS**, 1983, Pesticides and Bees, *Environ. Entomol.*, 12, 1513-1518.
- JONES T. O., A. G. LEE**, 1986, Effect of pyrethroids on the activity of a purified (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) ATPase, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 25, 420-426.
- JURAND J. P., M. BOUNIAS, R. CHAUVIN**, 1989, The survival hormones: azelaic and pimelic acids, suppress the stress elicited by isolation conditions on the steroids and phospholipids of adult worker honeybees., *Horm. Metab. Res.*, 21, 553-557.
- KASTURI A. R., R. CHANDRASHEKAR**, 1977, Inhibition of acetylcholinesterase as a criterion to determinate the degree of insecticide poisoning in *Apis cerana*, *J. Apic. Res.*, 16, (1), 112-114.

- KULINCEVIC J. M., W.C. ROTHENBULER**, 1989, Variation in food consumed by caged worker bees from different colonies, *J. Apic. Res.*, 1, (28), 26-29.
- KULKARNI A. P., E. HODGSON**, 1984, The metabolism of insecticide: The role of monooxygenase enzymes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24, 19.
- KUNERT K., K. CRAILSCHEIM**, 1988, Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein content in emerging worker honeybees and their mortality, *J. Apic. Res.*, 1, (28), 13-21.
- LADAS A.**, 1972, The influence of certain internal and external factors on the resistance of honeybees to insecticides., *Apidologie*.3, 55-78.
- LAMARTYN M.**, 1988, L'abeille en champs, *Rev. Fr. Apic.*, 478-479.
- M'DIAYE K., M. BOUNIAS**, 1993, Time and dose-related effects of the pyrethroid fluvalinate on haemolymph carbohydrates and gut lipids of honeybees following in vivo injection of very low doses., *Biomed. Environ. Sci.*, 6, 145-153.
- MACKENZIE K. E., M. L. WINSTON**, 1989, Effects of sublethal exposure to diazinon on longevity and temporal division of labor in honeybee (*Hymenoptera: Apidae*). *J. Econ. Entomol.*, 82, 75-82.
- MANSOUR S. A., M. K. AL-JILALI**, 1984, The residual toxicity to honeybees of some insecticides on clover flower: laboratory studies, *J. Apic. Res.*, 23, (4), 195-198.
- MANSOUR S. A., M. K. AL-JILALI**, 1985, The response of two honeybee races to certain insecticides, *Nat. Res. Cent. Egypt. Pest.*, 19, 39-40.
- MARTEL J.**, 1980, Chimie des pyr  thro  ides, *Actualit   de chimie th  rapeutique*, 7, 239-265.
- MARY M.**, 1981, La gel  e royale, trente années d'expériences., *Rev. Fr. Apic.*, B99, 10-13.
- MASSOULIE J., J. P. TOUTANT**, 1988, Vertebrate cholinesterase: structure and type of interaction in: whittaker VP. Ed. *Handbook of experimental pharmacology*, Berlin, 86, 167-224.
- MELKSCHAM K., N. JACOBSEN, J. RHODES**, 1988, Compounds which affect the behaviour of the honeybee, *Apis mellifera L*, *Bee World*, 69, (3), 105-124.

- METKALF L. R., B. MARCH**, 1990, Properties of acetylcholinesterase from the fly and mouse and their relation to insecticide action, *J. Environ. Entomol.*, 43, (5), 670-676.
- MOFFETT J.O., H.L. MORTON, R.H. MACDONALD**, 1972, Toxicity of some herbicidal sprays to honeybees., *J. Econ. Entomol.*, 65, (1), 32-36.
- MOLINENGO L.**, 1979, The curve dose survival time in the evaluation of acute toxicity, *J. Pharmacol.*, 343-344.
- MOODY R. P.**, 1978, The fate of fenitrothion in aquatic ecosystem, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 8-14.
- MORITZ R. F. A., F. HALLMEN**, 1986, Trophylaxie of worker honeybees *Apis mellifera* of different ages, *Insect. Soc.*, 31, 26-31.
- MORSE R.A., E. J. DYCE, A. C. GOULD**, 1965, The treatment of american foul brood in New York state, *Bee World*, 46, 15-17.
- MULLER T. A., V. C. SALGADO**, 1985, The pyrethroids insecticides, *Ed. J. Pleahey Taylor and Francis*, 58-62.
- MURPHY S. D.**, 1980, The basic science of poisons, 2nd edition, *DOULT Ed, KLAUSEN C.D.*, N.Y, 357-408.
- MURRAY A.**, 1985, Acute and residual toxicity of a new pyrethroid insecticide, WL85871 to honeybees, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 560-564.
- MYAMOTO J., Y. SATO**, 1968, Metabolic fate of sumithion in rice plant applied at the preheating stage, *Agric. Biol. Chem.*, 28, 422.
- NARAHASCHI T.**, 1980, Sites and types of action of prethroids on nerve membrane, in "*Prethroids insecticides, chemistry and action*", *Roussel uclaf, Paris*, 37, 15-17.
- NATION J. L., F. A. ROBINSON, S. J. YU, A. B. BOLTEN**, 1986, Influence upon honeybees of chronic exposure to very low levels of selected insecticides in their diet, *J. Apic. Res.*, 25, (3), 170-177.
- NAZAROV S.**, 1969, Possibilité pour les abeilles butineuses de rapporter dans la ruche avec la nourriture des insecticides organiques à forte concentration, *Bull. Apic.*, 12, 159-162.
- NECTOUX M., M. BOUNIAS**, 1988, Toxicologie du sulfate cuivrique chez l'abeille I. Nouveaux paramètres de létalité comme alternative à la DL50, *C. R. Soc. Biol.*, 182, 544-555.

- NECTOUX M., 1990**, Toxicologie de dérivé cuivriques proposés en traitement de la Varoase de l'abeille, *Apis mellifera*. L., thèse., Montpellier, 273p.
- NIJIMA K., K. OSAWA, 1985**, Toxicity of several insecticides to honeybees, influence of post treatment temperature, *Bull. Agric.*, 25, 83-90.
- NOBLE-NESBIT J., 1970**, Structural aspects of penetration through insects cuticules, *Pestic. Sci.*, 1, 204-208.
- NORMAN T. C., 1980**, Release of neurohormones in Blowflies *Calliphora vicina* with respect to insecticidal action in "insect neurobiology and pesticide action.", p.305, *Soc.Chem. Ind.*, London, 1980.
- OPPENOORTH F. J., 1984**, Biochemistry of insecticide resistance, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22, 187-195.
- ORCHARD I., 1980**, The effect of pyrethroids on the electrical activity of neurosecretory cells from the brain of *Rhodnius prolixus.*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 13, 220-226.
- OSBORNE M. P., 1982**, Site of action of pyrethroids in neuronal membrane as revealed by the resistances factors, *Pestic. Sci.*, 10, 407-413.
- PAIN J., 1969**, Nouveau modèle de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles en captivité, *Ann. Abeille*, 9, 71-76.
- PERSHAD S. D., 1966**, L'influence de l'âge sur les échanges de nouritures entre les abeilles ouvrières, *Insect. Soc.*, 13, (4), 323-328.
- PHAM M. H., B. ROGER, R. CHARLES, C. MASSON, 1982**, Variation en fonction de l'âge des ouvrières d'abeilles (*Apis mellifica ligustica*) du pouvoir d'attraction d'un extrait de phéromones royales, *Apidologie*, 13, 143-155.
- PHAM M. H., J. TROUILLER, C.M. CAILLAUD, C. MASSON, 1993**, Effect of queen pheromone on worker bees of different ages: behavioural and electrophysiological responses., *Apidologie*, 24, 267-281.
- POLLET J. F., 1987**, Ecotoxicologie de trois pyréthrinoides sur *Apis mellifera*, mémoire, *Université louvain*, 140 pp.
- POURTALLIER J., Y. TALIERCIO, 1969**, Méthode modifiée de recherche de résidus de pesticides dans les abeilles, *Bull. Apic.*, 2, 167-173.

- PULLMAN M. E., H. S. PENEFSKY, A. DATTA, E. RACKER**, 1960, Partial resolution of the enzyme catalysing oxidative phosphorylation. I-Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase., *J. Biol. Chem.*, 235, 3322-3329.
- RAJASHEKHARAPA B. J.**, 1979, Queen rearing of new queens by honeybee colonies (*Apis cerana*), *J. Apic. Res.*, 3, (18), 173-178.
- REMBOLD H. N. C., CZOPPELT**, 1982, the influence of synthetic and botanical insect growth regulators on the development of honeybee larvæ in vitro, *Second symposium on the harmonisation of method for testing the toxicity of pesticides to bees. Hohenheim, GFR. Septembre, Appendix 7*, 21-23.
- RICHTER A. R., J. R. FUXA**, 1984, Pathogen-pathogen and pathogen-insecticide interactions in Velertean caterpillar (*Lepidoptera Noctuidae*), *J. Econ. Entomol.*, 77, 1559-1564.
- ROBAUX P.**, 1986, varroa et varroatose, OPIDA Ed, 238p.
- ROGER B.**, 1974, L'influence de la reine d'abeilles (*Apis mellifera L*) sur la prise de nourriture des ouvrières accompagnatrices, *Apidologie*, 2, (2), 123-135.
- ROGER B., J. PAIN**, 1965, Influence de la reine d'abeille (*Apis mellifera*) sur le taux de mortalité des abeilles accompagnatrices, *J. Apic. Res.*, 5-35.
- RONIS M. J., E. HODGSON, W.C. DAUTUAM**, 1988, Characterization of multiple forms of cytochrome P450 from an insecticide resistant strain of house fly (*Musca domestica*), *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37, 74-90.
- SCHIRO J.**, 1986, Intoxications: Dépopulations massives, *Rev. Fr. Apic.*, 458, 559-561.
- SHIRES S. W., D. BENNET, P. DEBARY, J. LE BLANC**, 1984, The effects of large scale aerial applications of the pyrethroïd insecticides, on foraging bees, cinquième symposium international sur la pollinisation, *les colloques de l'INRA*, septembre, 21, 1984, 169-173..
- SHONO T., K. OHSAWA, J. E. CASIDA**, 1979, Metabolism of trans and Cis-perethrin and cis cypermethrin, and decamethrin by microsomal enzymes, *J. Agric. Food. Chem.*, 27, 316-325.
- SHRIKER B.**, 1974, The effect of sublethal doses of parathion on time sens of honeybees, *Apidologie*, 5, (2), 385-398.

- SINGH G. J. P.**, 1982, Bioresmethrin induced alteration in the ultrastructure of neurosecretory cells of insects in the corpora allata, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18, 1958-1968.
- SINGH G. J. P., I. ORCHARD**, 1982, Is insecticide-induced release of insect neurohormones a secondary effect of hyperactivity of the central nervous system, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 17, 232-242.
- SINGH G. J. P., L. ORCHARD**, 1983, action of bioresmethrin on the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*, *Pestic. Sci.*, 229, 14-23.
- SITBON G. J. P.**, 1967, l'effet de groupe et mortalité des abeilles d'hiver et d'été, isolées et groupées, *Ann. Abeille*, 10, (4), 204-212.
- SMIRLE M. J., M. C. WINSTON**, 1988, Detoxifying enzyme activity in worker honeybees: an adaptation for foraging contaminated ecosystem, *Can. J. Zool.*, 66, 1938-1942.
- SPENCER E. Y.**, 1972, Biochemistry and structure of organophosphorus pesticides in: *Toxicology, biodegradation and efficacy of livestock pesticides*, Khan & Haufe (Ed), Amsterdam, Netherlands, 1-22.
- STEVENSEN H., E. LESLY, J. SMART**, 1984, Laboratory estimation of toxicity of pyrethroids insecticides to honeybees: relevance to hazard in the field. British Crop protection conference. *Pests and Diseases.*, 4A, 20.
- SUNDARAM K. M. S.**, 1973, Degradation dynamics of fenitrothion insecticide in aquatic environment associated with forest spraying, *Sympos. Chem. Insect.*, 56, 19-21.
- SYMONS P. E. K.**, 1976, Dispersal and toxicology of insecticide fenitrothion, prediction hazardous of forest spraying, *Ren. Rev.*, 1-30.
- SZABO T. I.**, 1974, Behavioural studies on queen introduction in the honeybee (*Apis mellifera*), effect of age and storage conditions of virgin Queens on their attractiveness to workers, *J. Apic. Res.*, 13, (2), 127-135.
- SZABO T. I., TOWNSEND G. F.**, 1974, Behavioural studies on Queen introduction in the honeybee, effect of age of workers (from a colony with laying Queen) on their behaviour towards an introduction virgin Queen, *J. Apic. Res.*, 13, (1), 19-25.
- TESSIER R. J.**, 1982, Vers la deltaméthrine, monographie, *Roussel Uclaff*, Chap 1, 25-101.

- VAIL P.V., C. F. SOOHOO, R. S. SEAY, R. G. KILLINER**, 1972, Microbial control of lepdopterous pests of fall lettuce in Arizona and effects of chemical and microbial pesticide on parasitoids, *Environ. Entomol.*, 1, 780-785.
- VAISSIERE B. E.**, 1991, Honeybee stocking rate pollinator visitation, and pollination effectiveness in upland cotton grow for hybrid seed production, *Van Heemet & A.D e Ruijter Ed, Proc. 6th Pollination Symp, Acta Hort*, 288, 359-363.
- VAN DER BERKEN J.**, 1974, The action of allethrine on the peripheral nervous system of the frog, *Pestic. Sci.*, 8, 692-699.
- VON FRISCH K.**, 1955, Vie et moeurs des abeilles, *Albin michel ED, Paris*, 220p.
- WAHL O., K. ULM**, 1983, Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of honeybee *Apis mellifera carnica*, *Acta. Ecologia.*, 59, 106-128.
- WELTHUIS H. W.**, 1972, Observation on the transmission of queen substance in the honeybee, *Behaviour*, 41, 105-129.
- WINSTON M. L., S. J. KATZ.**, 1981, longevity of cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races., *Can. J. Genet. Cytol*, 59, 1571-1575.
- WITTMAN D.**, 1982, Tracer experiments on the passage of insecticides through nurse bees as a basis for determining intoxications in honeybee larvæ, *Apidologie*, 13, 328-330.
- YAP H., R. CUTKOMP**, 1970, Activity and rythm of ATPase in larvae of the mosquito, *Aedes aegypti L. Life. Sci.*, 9, 1419-1425.
- YAVADA R. P. S., M. V. S. MITH**, 1971, Agressive behaviour of *Apis mellifera* L. Workers towards introduced Queens. Behaviour mechanism involved in the relaease of worker agression, *Behaviour.*, 39, 212-236.
- YU S. J., F. A. ROBINSON, J. L. NATION**, 1984, Detoxication capacity in the honeybee, *Apis mellifera L., Pestic. Blochem. Physiol.*, 22, 360-368.
- ZBINDEN G. R., FLURY-ROVERSI**, 1981, Significance of LD50 test for the toxicological evaluation of chemical substances, *Arch.Toxicol.*, 47, 77-99.

**ANNEXES**

**Annexe 1**

Evolution du tréhalose et du glucose en (mmole/l) chez l'abeille après intoxication à la cypeméthrine et au fénitrothion

**Tableau 1:** Variation du glucose (mmole/l) dans l'hémolymphe d'abeille suite à une intoxication au fénitrothion et à la cyperméthrine. les moyennes ( $\bar{x}$ ) et écart-types ( $\sigma$ ) sont donnés pour N=6 déterminations pour chaque série. (\*) Indiquent les différences significatives à ( $P < 0,05$ ).

|                     |  | <b>Cyperméthrine</b>   |                        |                        |                         |                        |                       |
|---------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| dose(nmole/abeille) |  | 0,01                   | 0,02                   | 0,04                   | 0,08                    | 0,1                    | Témoin                |
| temps(min)          |  |                        |                        |                        |                         |                        |                       |
| 0                   |  | <b>3,08</b><br>(1,46)  | <b>2,96</b><br>(0,58)  | <b>3,06</b><br>(1,20)  | <b>2,95</b><br>(0,45)   | <b>3,01</b><br>(1,33)  | <b>3,24</b><br>(0,56) |
| 15                  |  | <b>3,80</b><br>(1,12)  | <b>3,85</b><br>(1,80)  | <b>3,70</b><br>(1,02)  | <b>3,45</b><br>(1,96)   | <b>3,83</b><br>(0,12)  | <b>3,20</b><br>(1,50) |
| 30                  |  | <b>2,02</b><br>(1,78)  | <b>1,89*</b><br>(0,78) | <b>1,70*</b><br>(0,80) | <b>1,45*</b><br>(0,49)  | <b>3,13*</b><br>(0,93) | <b>2,85</b><br>(1,86) |
| 60                  |  | <b>2,48</b><br>(1,07)  | <b>1,75*</b><br>(0,49) | <b>1,28*</b><br>(0,39) | <b>1,12*</b><br>(1,47)  | <b>1,20*</b><br>(0,19) | <b>2,84</b><br>(0,39) |
| 120                 |  | <b>2,56</b><br>(0,80)  | <b>1,72*</b><br>(0,58) | <b>1,68</b><br>(0,80)  | <b>1,90*</b><br>(0,043) | <b>2,12*</b><br>(0,93) | <b>2,6</b><br>(0,46)  |
| 180                 |  | <b>2,68*</b><br>(0,29) | <b>2,12*</b><br>(0,32) | <b>1,99*</b><br>(0,80) | <b>2,02*</b><br>(0,60)  | <b>2,13*</b><br>(0,33) | <b>2,72</b><br>(0,36) |
|                     |  | <b>Fénitrothion</b>    |                        |                        |                         |                        |                       |
| dose(nmole/abeille) |  | 0,01                   | 0,02                   | 0,04                   | 0,08                    | 0,1                    | Témoin                |
| temps(min)          |  |                        |                        |                        |                         |                        |                       |
| 0                   |  | <b>3,80</b><br>(0,46)  | <b>3,70</b><br>(0,63)  | <b>3,80</b><br>(1,20)  | <b>4,00</b><br>(1,45)   | <b>3,92</b><br>(0,33)  | <b>4,00</b><br>(1,56) |
| 15                  |  | <b>4,70</b><br>(0,25)  | <b>3,65</b><br>(0,80)  | <b>4,70</b><br>(4,02)  | <b>4,40</b><br>(1,96)   | <b>4,03</b><br>(0,32)  | <b>4,40</b><br>(2,60) |
| 30                  |  | <b>4,30</b><br>(0,78)  | <b>3,01</b><br>(0,85)  | <b>3,80</b><br>(0,80)  | <b>3,80</b><br>(0,49)   | <b>2,20*</b><br>(0,93) | <b>3,60</b><br>(1,86) |
| 60                  |  | <b>3,25</b><br>(1,67)  | <b>3,50</b><br>(0,49)  | <b>4,80*</b><br>(1,39) | <b>3,60</b><br>(1,47)   | <b>1,89*</b><br>(0,59) | <b>3,80</b><br>(0,39) |
| 120                 |  | <b>4,012</b><br>(0,80) | <b>3,20</b><br>(0,69)  | <b>3,60</b><br>(0,80)  | <b>3,60</b><br>(2,43)   | <b>2*</b><br>(0,93)    | <b>4,05</b><br>(1,46) |
| 180                 |  | <b>3,40</b><br>(1,17)  | <b>2,60*</b><br>(1,36) | <b>3,40</b><br>(0,80)  | <b>3,75</b><br>(0,60)   | <b>1,10*</b><br>(0,33) | <b>4,15</b><br>(1,86) |

**Tableau 2:** Variation du Tréhalose (mmole/l) dans l'hémolymphe d'abeille suite à une intoxication au fénitrothion et à la cyperméthrine. les moyennes ( $\bar{x}$ ) et écart-types ( $\sigma$ ) sont donnés pour N=6 déterminations pour chaque série. (\*) indiquent les différences significatives ( $P < 0,05$ ).

|                     |             | Cyperméthrine   |                  |                  |                  |                  |                  |
|---------------------|-------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| dose(nmole/abeille) |             | 0,01            | 0,02             | 0,04             | 0,08             | 0,1              | Témoin           |
|                     | temps (min) |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
|                     | 0           | 28,80<br>(3,68) | 30,60<br>(6,66)  | 26,30<br>(7,45)  | 23,40<br>(1,45)  | 28,63<br>(3,33)  | 30,50<br>(6,56)  |
|                     | 15          | 32,80<br>(6,96) | 31<br>(4,30)     | 29,40<br>(4,02)  | 28,40<br>(1,96)  | 32,25<br>(0,32)  | 30,00<br>(9,60)  |
|                     | 30          | 28,20<br>(5,78) | 15,54*<br>(2,05) | 18,80*<br>(3,12) | 17,40*<br>(0,49) | 15,30*<br>(2,73) | 26,40<br>(8,86)  |
|                     | 60          | 27,13<br>(4,17) | 10,40*<br>(0,49) | 10,80*<br>(1,39) | 8,80*<br>(3,57)  | 10,25*<br>(1,89) | 26,30<br>(10,39) |
|                     | 120         | 22,00<br>(2,0)  | 15,50*<br>(0,69) | 16,60*<br>(3,45) | 10,20*<br>(3,43) | 8,3*<br>(0,43)   | 24,40<br>(7,46)  |
|                     | 180         | 21,30<br>(4,27) | 18,70*<br>(6,36) | 16,40<br>(1,12)  | 12,20<br>(3,60)  | 12,20<br>(3,23)  | 26,60<br>(5,86)  |
|                     |             | Fénitrothion    |                  |                  |                  |                  |                  |
| dose(nmole/abeille) |             | 0,01            | 0,02             | 0,04             | 0,08             | 0,1              | témoin           |
|                     | temps(mn)   |                 |                  |                  |                  |                  |                  |
|                     | 0           | 23,80<br>(0,25) | 21<br>(0,63)     | 23,80<br>(1,20)  | 24,40<br>(2,45)  | 24,50<br>(2,33)  | 25,50<br>(1,23)  |
|                     | 15          | 32,80<br>(3,45) | 30,40<br>(0,45)  | 34,50<br>(3,56)  | 35,60<br>(2,65)  | 36,20<br>(3,45)  | 32,00<br>(2,45)  |
|                     | 30          | 26,80<br>(2,12) | 13,20<br>(1,23)  | 13,80<br>(0,25)  | 13,60<br>(0,12)  | 20,80<br>(0,46)  | 29,40<br>(3,65)  |
|                     | 60          | 24,60<br>(5,96) | 13,80*<br>(2,45) | 13,40*<br>(0,23) | 13,80*<br>(0,12) | 10,80*<br>(3,12) | 26,30<br>(2,45)  |
|                     | 120         | 22,65<br>(6,96) | 10,60*<br>(0,21) | 10,40*<br>(2,25) | 10,20*<br>(2,34) | 12*<br>(0,46)    | 24,40<br>(2,78)  |
|                     | 180         | 22,80<br>(5,25) | 12,20*<br>(1,25) | 11,20*<br>(4,30) | 11,60*<br>(2,45) | 11,20*<br>(0,86) | 26,60<br>(0,45)  |

**Annexe 2**

Evolution de la surface alvéolaire chez le lot traité à la cyperméthrine et les lots témoins  
pendant l'essai sur le terrain

| Colonies | Semaine | Surface (cm <sup>2</sup> ) | Moyenne |
|----------|---------|----------------------------|---------|
| 1        | 2       | 3786                       | 946,50  |
| 1        | 4       | 6263                       | 1024,83 |
| 1        | 6       | 2224                       | 827,60  |
| 1        | 8       | 2842                       | 568,40  |
| 1        | 10      | 3013                       | 753,25  |
| 1        | 12      | 3260                       | 815     |
| 1        | 14      | 2532                       | 633     |
| 1        | 16      | 2325                       | 581,25  |
| 2        | 2       | 3836                       | 959     |
| 2        | 4       | 5622                       | 1124,40 |
| 2        | 6       | 4244                       | 1061    |
| 2        | 8       | 3228                       | 538     |
| 2        | 10      | 3063                       | 612,60  |
| 2        | 12      | 3326                       | 625,20  |
| 2        | 14      | 3125                       | 625     |
| 2        | 16      | 2756                       | 689     |
| 2        | 18      | 2681                       | 670,25  |
| 3        | 2       | 4384                       | 1096    |
| 3        | 4       | 4695                       | 1173    |
| 3        | 6       | 4888                       | 976,20  |
| 3        | 8       | 2742                       | 685     |
| 3        | 10      | 3561                       | 712     |
| 3        | 12      | 2469                       | 617,25  |
| 3        | 14      | 2600                       | 650     |
| 3        | 16      | 840                        | 840     |
| 3        | 18      | 00                         | 00      |
| 4        | 2       | 4735                       | 1183,75 |
| 4        | 4       | 5466                       | 1093,20 |
| 4        | 6       | 4133                       | 822,60  |
| 4        | 8       | 00                         | 00      |
| 4        | 10      | 00                         | 00      |
| 4        | 12      | 00                         | 00      |
| 5        | 2       | 2404                       | 620     |
| 5        | 4       | 2045                       | 511,25  |
| 5        | 6       | 2140                       | 535     |
| 5        | 10      | 1074                       | 268,50  |
| 5        | 12      | 833                        | 416,50  |
| 5        | 14      | 00                         | 00      |
| 6        | 2       | 4128                       | 825,60  |
| 6        | 4       | 3919                       | 783,20  |
| 6        | 6       | 3402                       | 850,50  |
| 6        | 8       | 1478                       | 492,60  |
| 6        | 10      | 1104                       | 552     |

|    |    |      |         |
|----|----|------|---------|
| 6  | 12 | 1460 | 486,20  |
| 6  | 14 | 1780 | 53,33   |
| 6  | 16 | 1130 | 376,20  |
| 6  | 18 | 1032 | 344     |
| 7  | 2  | 3123 | 755,50  |
| 7  | 4  | 4527 | 780     |
| 7  | 6  | 5292 | 882     |
| 7  | 8  | 3218 | 643,60  |
| 7  | 10 | 3505 | 701     |
| 7  | 12 | 1054 | 527     |
| 7  | 14 | 725  | 52,50   |
| 7  | 16 | 687  | 24,15   |
| 7  | 18 | 672  | 241,67  |
| 12 | 2  | 1850 | 902,50  |
| 12 | 4  | 3358 | 1119,33 |
| 12 | 6  | 00   | 00      |
| 12 | 10 | 00   | 00      |
| 12 | 12 | 218  | 218     |
| 13 | 2  | 4592 | 1148    |
| 13 | 4  | 4306 | 1076,50 |
| 13 | 6  | 3427 | 856,75  |
| 13 | 8  | 1774 | 592,67  |
| 13 | 10 | 2052 | 513     |
| 13 | 12 | 1677 | 838,50  |
| 13 | 14 | 2645 | 881,67  |
| 13 | 16 | 2214 | 738     |
| 13 | 18 | 2077 | 692,33  |
| 14 | 2  | 3270 | 817,50  |
| 14 | 4  | 2837 | 945,67  |
| 14 | 6  | 3976 | 994     |
| 14 | 8  | 1527 | 509     |
| 14 | 10 | 1515 | 505     |
| 14 | 12 | 1549 | 644,25  |
| 14 | 14 | 2577 | 426,50  |
| 14 | 16 | 1706 | 644     |
| 14 | 18 | 1061 | 530     |
| 15 | 2  | 3045 | 1015    |
| 15 | 4  | 3250 | 1083,33 |
| 15 | 6  | 2431 | 810,33  |
| 15 | 8  | 1233 | 616,50  |
| 15 | 10 | 1268 | 634     |
| 15 | 12 | 528  | 267     |
| 15 | 14 | 00   | 00      |
| 15 | 16 | 00   | 00      |
| 15 | 18 | 00   | 00      |
| 16 | 2  | 4091 | 1022,75 |

|    |    |      |         |
|----|----|------|---------|
| 24 | 6  | 2928 | 732     |
| 24 | 8  | 2216 | 554     |
| 24 | 10 | 2381 | 595,25  |
| 24 | 12 | 2012 | 503     |
| 24 | 14 | 2607 | 521,40  |
| 24 | 16 | 2027 | 506,75  |
| 24 | 18 | 1466 | 486,33  |
| 25 | 2  | 3991 | 997,75  |
| 25 | 4  | 5945 | 1189    |
| 25 | 6  | 3919 | 783,80  |
| 25 | 8  | 2703 | 628,60  |
| 25 | 10 | 3143 | 540,75  |
| 25 | 12 | 2602 | 650,50  |
| 25 | 14 | 3684 | 921     |
| 25 | 16 | 3542 | 885,50  |
| 25 | 18 | 2450 | 601,25  |
| 26 | 1  | 1088 | 544     |
| 26 | 2  | 264  | 264     |
| 26 | 3  | 00   | 00      |
| 27 | 1  | 2426 | 808,67  |
| 27 | 2  | 5335 | 1070,20 |
| 27 | 3  | 00   | 00      |

lot traité: colonies de 1 à 7

lot témoin + sirop: colonies de 11 à 18

lot témoin sans sirop: colonies de 21 à 27

**Annexe 3**

Paramètres décrivant l'évolution générale des ruches

|               |    | semaine |             |                |                |                |                |                 |                |                |
|---------------|----|---------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| paramètres    |    | 2       | 4           | 6              | 8              | 10             | 12             | 14              | 16             | 18             |
| NC            | TR | 0       | 2<br>(0,18) | 4<br>(0,18)    | 5<br>(0,31)    | 4,86<br>(0,31) | 3,57<br>(0,75) | 3,86<br>(0,83)  | 1,14<br>(0,22) | 1,14<br>(0,22) |
|               | TS | 0       | 3<br>(0,15) | 3<br>(0,10)    | 3,86<br>(0,14) | 3,71<br>(0,18) | 2,71<br>(0,52) | 2,43<br>(0,47)  | 2<br>(0,12)    | 2<br>(0,12)    |
|               | TE | 0       | 2<br>(0,12) | 3,07<br>(0,20) | 4,71<br>(0,18) | 4,57<br>(0,20) | 3<br>(0,82)    | 2,936<br>(0,53) | 3<br>(0,53)    | 3<br>(0,53)    |
|               |    |         |             |                |                |                |                |                 |                |                |
| NT            | TR | 5       | 6<br>(0,14) | 6,43<br>(0,20) | 7,14<br>(0,26) | 7,71<br>(0,42) | 8<br>(0,24)    | 8,29<br>(0,68)  | 8,29<br>(0,68) | 8,29<br>(0,68) |
|               | TS | 5       | 5           | 5,29<br>(0,18) | 5,43<br>(0,26) | 5,29<br>(0,18) | 5,86<br>(0,42) | 5,14<br>(0,14)  | 5,14<br>(0,14) | 5,14<br>(0,14) |
|               | TE | 5       | 5           | 5,86<br>(0,34) | 6<br>(0,86)    | 6,29<br>(0,40) | 6,86<br>(0,26) | 7,14<br>(0,34)  | 7,14<br>(0,34) | 7,14<br>(0,34) |
|               |    |         |             |                |                |                |                |                 |                |                |
| f(%)          | TR | 0       | 0           | 14             | 42             | 57             | 71             | 71              | 86             | 86             |
|               | TS | 0       | 0           | 14             | 28             | 28             | 28             | 42              | 42             | 42             |
|               | TE | 0       | 0           | 0              | 14             | 14             | 28             | 28              | 28             | 28             |
|               |    |         |             |                |                |                |                |                 |                |                |
| ruches mortes | TR | 0       | 0           | 0              | 0              | 0              | 1              | 2               | 5              | 5              |
|               | TS | 0       | 0           | 0              | 0              | 0              | 0              | 0               | 1              | 1              |
|               | TE | 0       | 0           | 0              | 0              | 1              | 1              | 0               | 2              | 2              |

NI: nombre total de cadres

NC: nombre de cadres à couvain

f(%): Fréquence de changement des reines en %

TR: lot traité

TS: lot témoin nourri au sirop de saccharose

TE: lot témoin no nourri

**Annexe 4**

Paramètres climatiques relevés sur le site expérimental

| Semaine | Température (°C) |           | Humidité relative |           | Précipitations (mm) |
|---------|------------------|-----------|-------------------|-----------|---------------------|
|         | Minimales        | Maximales | Minimales         | Maximales |                     |
| 1       | 16               | 24,5      | 53,75             | 96        | 5,2                 |
| 2       | 16,57            | 24        | 59,29             | 93,43     | 12,3                |
| 3       | 20               | 26,75     | 46,71             | 92,86     | 0                   |
| 4       | 19               | 29        | 49,71             | 92,43     | 0                   |
| 5       | 21               | 30,12     | 40,43             | 88,8      | 0                   |
| 6       | 18,5             | 33,57     | 50,83             | 92        | 0                   |
| 7       | 16,71            | 33,67     | 41,14             | 86,71     | 4                   |
| 8       | 19,88            | 27,57     | 47,33             | 94        | 0                   |
| 9       | 11,83            | 30,12     | 51,67             | 94,83     | 0                   |
| 10      | 9,17             | 26,83     | 30,83             | 8,67      | 6                   |
| 11      | 12,33            | 21,33     | 41,67             | 81        | 25                  |
| 12      | 12,75            | 24,63     | 40,83             | 91        | 0                   |
| 13      | 13,2             | 24,25     | 59                | 93        | 56                  |
| 14      | 12,4             | 18,4      | 96                | 98,6      | 115                 |
| 15      | 4,6              | 23,6      | 55                | 96        | 6,5                 |
| 16      | 8                | 16        | 51                | 67        | 60                  |
| 17      | 8                | 12,83     | 41,67             | 85,83     | 39                  |
| 18      | 8                | 16,67     | 33,57             | 74        | 3                   |

**Annexe 5**

Accords pour publication dans le Journal:

*1-International Journal of Occupational. Medicine and Toxicology*

# Occupational Medicine and Toxicology

OFFICIAL ORGAN OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF OCCUPATIONAL MEDICINE AND TOXICOLOGY  
Devoted to prevention of Occupational and Environmental Diseases

## Editor-in-Chief .....

Nachman Brautbar, M.D.  
S.C. School of Medicine  
22 Ocean View Avenue  
Suite 100  
Los Angeles, CA 90057  
Tel: 213-365-4000

## Associate Editors .....

William Marcus, Ph.D.  
U.S. EPA, Washington, DC

George Chiriboga, M.D.  
Universidad de Puerto Rico  
San Juan, PR

Anders Englund, M.D.  
Sveinbjørn S. Eghalsan, the Construction  
Industry's Organization for Working  
Environment, Safety & Health,  
Copenhagen, Denmark

Richard Frank, M.D.  
University of Kentucky  
Lexington, KY

Henning Lippe Grandjean, M.D.  
Aarhus Universitet, Denmark

Thomas Morris Greenberg, M.D.  
London, England

Yuri Izmerov  
Institute of Industrial Hygiene and  
Occupational Diseases  
Academy of Medical Sciences, USSR

Philip J. Landrigan, M.D.  
Sinai School of Medicine  
New York, NY

William S. Legator, M.D.  
University of Texas Medical Branch,  
Galveston, TX

Giuseppe Maltoni, M.D.  
Istituto Nazionale Tumori, Milan, Italy

Myron A. Mehlman, Ph.D.  
DNJ-Robert Wood Johnson  
Medical School, Piscataway, NJ

Richard Monosson, M.D.  
UCLA School of Medicine  
Los Angeles, CA

Yoshio Okubo, M.D.  
University of Occupational and  
Environmental Health  
Kyushu, Japan

David D. Richter, M.D.  
Hebrew University - Hadassah  
Medical School  
Jerusalem, Israel

James Rosenstock, M.D.  
University of Washington  
Seattle, WA

Imre Sugar, M.D.  
National Oncological Institute  
Budapest, Hungary

March 21, 1994

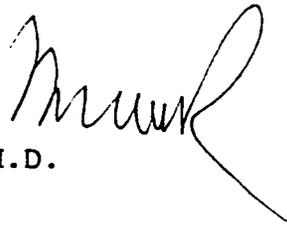
Professeur Michel Bounias, D.Sc., D.R.  
Universite d'Avignon  
Biomathematique et toxicologie  
23 rue du 58 eme R.I.  
F 84000 Avignon (France)

Dear Dr. Bounias:

Your revised manuscript has been reviewed by the  
Editorial Board and accepted for publication. You  
should hear from the Managing Editor's office soon.

Thank you.

Yours sincerely,



Nachman Brautbar, M.D.  
Editor-in-Chief

NB/lc

cc: Dr. Myron Mehlman

**Annexe 6**

Articles soumis pour publication dans les journaux:

*2-Crop Protection*

*3-Toxicologie letters*

*4-Environmental Entomology*

**2**

**LD50 Variability of cypermethrin (Pyrethroid) and fenitrothion (organophosphate) on honeybees (*Apis mellifera*. L) versus age, formulation and CPV (Chronic Paralysis Virus)/ Insecticide interaction.**

**NAJIB BENDAHO\*, MICHEL BOUNIAS †, CECILE FLECHE\***

**\* Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires Sophia-Antipolis (FRANCE)**

**Tel: (33) 92 96 00 20, and fax: (33) 92 96 00 22**

**† Université d'Avignon, Biomathématique et toxicologie, 23 rue du 58 ème R.I, F 84000**

**AVIGNON (FRANCE) Tel: (33) 90 85 44 05, and fax: (33) 90 86 38 61**

**1. Key words: Cypermethrin®, fenitrothion®, emerging worker honeybees, LD50-test, pathogen, interaction.**

**2. All correspondence should be addressed to: Prof. M. BOUNIAS, Université d'Avignon, Biomathématique et toxicologie, 23 rue du 58 ème R.I, F 84000 AVIGNON (FRANCE) (or: " 33, rue Pasteur" for " recommended" or " chronopost " envoices) fax: (33) 90 86 38 61**

③

**Comparative toxicity of cypermethrin and fenitrothion, on the haemolymph carbohydrates, head Acetylcholinesterase and thoracic-muscle  $(Na^+, K^+)$  ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera*. L).**

**NAJIB BENDAHOU\*, MICHEL BOUNIAS †, CECILE FLECHE\***

\* Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires Sophia-Antipolis (FRANCE)

Tel: (33) 92 96 00 20, and fax: (33) 92 96 00 22

† Université d'Avignon, Biomathématique et toxicologie, 23 rue du 58 ème R.I, F 84000

AVIGNON (FRANCE) Tel: (33) 90 85 44 05, and fax: (33) 90 86 38 61

1. **Key words:** Cypermethrin, fenitrothion, honeybees, carbohydrates, Acetylcholinesterase, ATPase( $Na^+$ ,  $K^+$ ), Toxicity.

2. All correspondence should be addressed to: Prof. M. BOUNIAS, Université d'Avignon, Biomathématique et toxicologie, 23 rue du 58 ème R.I, F 84000 AVIGNON (FRANCE) (or: " 33 rue Pasteur" for " recommended" or " chronopost " envoices) fax: (33) 90 86 38 61



# ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA

9301 ANNAPOLIS ROAD • LANHAM, MARYLAND 20706-3115 • (301) 731-4535

Manuscript number: E94-173

Date: 08/01/94

CECILE FLECHE  
CENTRE NATIONAL D'ETUDES  
VÉTÉRINAIRES ET ALIMENTAIRES SOPHIA  
ANTIPOLIS  
FRANCE

Author: CECILE FLECH, NAJIB BENDAHO, MICHEL BOUNIAS, JEAN P. FAUCON &  
PATRICK DRAJNUDEL

Title: FIELD ASSAYS ON BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ...

Editor: DR. STINNER

Editor's phone: (919) 515-2638

- We have received your manuscript and sent it to the subject editor for consideration in
- |                                                              |                                                         |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Annals of the ESA                   | <input type="checkbox"/> Journal of Economic Entomology |
| <input type="checkbox"/> Bulletin of the ESA                 | <input type="checkbox"/> Journal of Medical Entomology  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Environmental Entomology | <input type="checkbox"/> Miscellaneous Publications     |

All manuscripts are subject to peer review, which can take as long as five months to complete. If you have any questions concerning the review of your paper, please call the editor.

- The manuscript named above cannot be processed in its current form. Please resubmit it once the area of deficiency shown below has been corrected:

Please double space the following:

Please replace illustrations with camera-ready copy (one set) and two sets of photocopies.

If you have any questions, please call or write to the Publications Office.

Sincerely,

*Erin K. Stoddy*  
Publications Office

**Field assays on biological and biochemical effects of chronic exposure to very low level of dietary cypermethrin 'Cymbush' on honeybee colonies (*Apis mellifera mellifera*. L).**

**CECILE FLECHE\*, NAJIB BENDAHO\*, MICHEL BOUNIAS †,  
JEAN P. FAUCON\*, PATRICK DRAJNUDEL\*.**

\* Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires Sophia-Antipolis (FRANCE)

Tel: (33) 92 96 00 20, and fax: (33) 92 96 00 22

† Université d'Avignon, Biomathématique et toxicologie, 23 rue du 58 ème R. I, F 84000

AVIGNON (FRANCE) Tel: (33) 90 85 44 05, and fax: (33) 90 86 38 61.

1. Key words: Cypermethrin, honeybees, chronic-test, field assays, carbohydrates, ATP, proteins, behaviour, brood areas.

2. All correspondence should be addressed to: Prof. M. BOUNIAS, Université d'Avignon, Biomathématique et toxicologie, 23 rue du 58 ème R. I, F 84000 AVIGNON (FRANCE) (or: " 33 rue Pasteur" for " recommended" or " chronopost " envoices) fax: (33) 90 86 38 61.

## RESUME

L'étude comparative de la toxicité de deux classes d'insecticides, les pyrethriinoïdes et les organophosphorés, représentés respectivement par la cyperméthrine et le fénitrothion sur l'abeille mellifère (*Apis mellifera mellifera*. L) est développée en 3 parties appuyées sur une synthèse bibliographique générale.

La première partie expose les résultats des essais au laboratoire visant à évaluer la toxicité létale de ces deux insecticides, à l'aide d'un nouveau concept algébrique, dérivé de l'équation de Hill comme alternative à la DL50. Ces nouveaux paramètres permettent une évaluation précise de la toxicité des substances étrangères, et peuvent être utilisés pour comparer et classer les composés relativement à leur paramètres calculés. La cyperméthrine semble être plus toxique que le fénitrothion relativement à ces paramètres.

La seconde partie présente l'analyse de l'impact de la cyperméthrine et du fénitrothion sur le métabolisme glucidique (glucose & tréhalose) et enzymatique [ATPase ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) & Acétylcholinésterase (AChE)] qui se trouvent affectés par ces deux insecticides. Cependant l'action négative de la cyperméthrine (AChE) est à prendre avec précaution

Le troisième chapitre porte sur l'étude en plein champs des perturbations qui surviennent dans le métabolisme glucidique et enzymatique, dans la surface alvéolaire, dans l'activité des abeilles, dans le comportement et enfin dans la disparition de la majeure partie des ruches traitées avec une dose sub létale de cyperméthrine.