

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

relatif à la publication de l'article de Vidau et al. portant sur les effets d'une exposition d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 1^{er} décembre 2011 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) sur la publication de l'article de Vidau *et al*¹. relatif à des effets d'une exposition d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation SONIDO² à base de thiaclopride en traitement des semences de maïs a fait l'objet d'une évaluation des risques par l'ANSES après consultation du Comité d'experts spécialisé "Produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques", réuni les 28 et 29 juin 2011 (dossier n° 2010-1483, avis du 16 août 2011). Cette évaluation a permis de conclure, qu'en l'état actuel des données disponibles, les risques pour les abeilles et autres pollinisateurs liés à l'utilisation de la préparation SONIDO en traitement de semences de maïs étaient considérés comme acceptables.

Le 28 juin 2011, le journal en ligne PLoS ONE a publié l'article "Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*".

Cet article décrit une étude réalisée par infection artificielle, en laboratoire, d'abeilles par l'agent parasite de la nosérose (*Nosema ceranae*) et un nourrissage des abeilles par des solutions contenant du fipronil ou du thiaclopride. La conclusion à laquelle aboutissent ces auteurs est que l'on constate une mortalité plus importante des abeilles infectées artificiellement par la nosérose lorsqu'elles sont également exposées à du fipronil ou du thiaclopride.

¹ Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. C. Vidau, M. Diogon, J. Aufauvre, R. Fontbonne, B. Viguès, J-L. Brunet, C. Texier, D. G. Biron, N. Blot, H. El Alaoui, L. P. Belzunces, F. Delbac. PLoS ONE, June 2011, Vol 6, Issue 6.

² SONIDO est le nouveau nom de la préparation DESIMO, nom sous lequel l'évaluation a été conduite.

Cette publication, ou les travaux auxquels elle se rattache, n'ont pas été pris en compte dans le cadre de l'évaluation des risques qui a conduit à l'avis de l'ANSES du 16 août 2011, relatif à la demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation SONIDO à base de thiaclopride.

L'objet de la saisine est d'indiquer si cette étude est de nature à remettre en cause les conclusions de l'évaluation telles que figurant dans cet avis.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise a été réalisée par la Direction des produits réglementés et le comité d'experts spécialisé "produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques" a été consulté les 24 et 25 janvier 2012.

3. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

● Le contexte scientifique

Les changements physiologiques induits chez les insectes par la plupart des parasites (insectes, acariens, champignons, bactéries, virus,...), se traduisent généralement par une sensibilité accrue de l'insecte aux divers stress environnementaux naturels ou anthropiques comme les polluants. Ce concept est largement exploité en protection intégrée où divers parasites entomopathogènes peuvent être utilisés en association avec des doses réduites d'insecticides. Il s'agit dans ce cas d'un effet additif ou de synergie recherchée, mais il est également évident, qu'en termes de risque, différentes interactions non recherchées sont susceptibles de se produire lorsque des facteurs de stress (tels les pathogènes d'insectes) et des polluants (comme les insecticides) sont présents de manière concomitante.

La question posée par l'article sur un éventuel accroissement de toxicité du fipronil et du thiaclopride sur des abeilles infectées par *N. ceranae* est donc scientifiquement pertinente.

● L'expérience et ses résultats

Alaux *et al.* (2009)³ ont décrit pour la première fois une interaction synergique entre une infection par *Nosema* et une exposition à un insecticide (imidaclopride) se traduisant par des mortalités plus élevées chez les abeilles infectées et exposées. Une interaction entre l'infection et le système de détoxification a été supposée. L'objet de l'expérience est de démontrer une interaction synergique entre une infection par *Nosema ceranae* et une exposition à deux autres insecticides, thiaclopride et fipronil, et de tester l'hypothèse métabolique.

Environ 2000 abeilles émergentes issues de trois colonies Buckfast croisées avec *Apis mellifera mellifera* ont été utilisées. Les colonies étaient indemnes de *Nosema* spp. (analyse par PCR⁴). Les cadres à couvain operculé ont été placés en incubateur afin de sélectionner une population d'abeilles homogène âgées de 5 jours pour l'expérience et réparties en 6 groupes à raison de 50 abeilles/cage (le nombre de répétition par groupe n'est pas précisé) :

³ Publication citée dans Vidau *et al.* (2011).

Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, et al. (2009) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). Environ Microbiol 12: 774–782.

⁴ PCR : polymerase chain reaction

Groupes	Infection par <i>Nosema ceranae</i> Abeilles âgées de 5 jours (Ji ⁵)	Exposition insecticide de Ji + 10 à Ji + 20
Contrôle	non	non
Infecté	Oui (1)	non
Fipronil	non	Oui (2)
Thiaclopride	non	Oui (3)
Infecté et fipronil	Oui (1)	Oui (2)
Infecté et thiaclopride	Oui (1)	Oui (3)

(1) Dose nominale : 125000 spores / abeille par voie orale

(2) Concentration journalière nominale : 1 µg fipronil/L

(3) Concentration journalière nominale : 5,1 mg thiaclopride/L

Les spores de *Nosema ceranae* ont été dénombrées dans les tractus digestifs. Dix jours après infection, le succès de l'infection a été confirmé dans les abeilles infectées par dénombrement de spores ($18,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ spores/abeille) et analyse cytologique des épithéliums intestinaux. L'absence de spores dans les abeilles non infectées a été vérifiée.

Le symptôme principal de l'infection par *Nosema ceranae* est un stress énergétique⁶. La consommation de sirop par les abeilles infectées a été significativement supérieure à la consommation de sirop par les abeilles non infectées (consommations de Ji à Ji + 10).

Les activités 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase (ECOD) et glutathion-S-transférase (GST) sont représentatives des enzymes de détoxification de phase I et II, respectivement. Elles ont été mesurées dans les extraits d'intestins moyens ou d'abdomens sans tractus digestif (corps gras). Dix jours après l'infection, l'activité ECOD n'a pas été significativement différente dans les extraits des groupes infectés et non infectés, alors que l'activité GST a été significativement plus élevée dans les extraits des groupes infectés.

La mortalité a été relevée quotidiennement. La consommation journalière a été relevée pour déterminer les doses moyennes d'exposition aux insecticides.

L'exposition sub létale au fipronil ou au thiaclopride entraîne une mortalité significativement plus élevée des abeilles infectées, alors que cette même exposition n'augmente pas la mortalité des abeilles non infectées, comparée à la mortalité des abeilles non infectées et non exposées.

Les doses d'exposition totales et journalières sont similaires entre les groupes d'abeilles infectées et non infectées. Des signes d'intoxication ont été observés chez les abeilles infectées et exposées (agressivité, tremblement, ataxie) alors qu'aucun signe d'intoxication n'a été observé chez les abeilles non infectées et exposées.

Vingt jours après l'infection et dix jours après l'exposition, les quantités de spores dans les abeilles infectées sont significativement différentes (Groupe Infecté + fipronil : $74,8 \times 10^6 \pm 12,0 \times 10^6$ spores/abeille, Groupe Infecté : $112,1 \times 10^6 \pm 16,7 \times 10^6$ spores/abeille, Groupe Infecté + thiaclopride : $156,9 \times 10^6 \pm 13,3 \times 10^6$ spores/abeille).

Les auteurs concluent que cette expérience confirme que des doses sublétales d'insecticides peuvent devenir létales lorsque les abeilles sont infectées par la nosérose. Le mécanisme pouvant expliquer cet effet synergique (qualificatif employé par les auteurs de la publication) n'est pas élucidé. Cependant, les résultats suggèrent une faible corrélation avec le mécanisme de détoxification dans les abeilles infectées ou avec le taux de prolifération des spores.

⁵ Ji : jour de l'infection

⁶ Mayack C, Naug D (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. J Invertebr Pathol 100: 185–188.

- **Commentaires sur la publication**

L'expérience a été réalisée au laboratoire dans des conditions contrôlées. Les faibles mortalités cumulées dans les témoins et les modalités exposées aux concentrations sublétales d'insecticides, inférieures à 10 % au bout de 20 jours d'essai et de 10 jours d'exposition sublétale, indiquent de bonnes conditions expérimentales, bien que celles-ci soient artificielles.

Selon les auteurs, les niveaux d'invasion par *Nosema ceranae* observés 10 jours après infection seraient représentatifs des niveaux observés dans les abeilles butineuses par Higes *et al.* (2008)⁷. L'absence de mortalité au bout de 10 jours est en contradiction avec les résultats de Higes *et al.* (2006)⁸ montrant 100 % de mortalité au bout de 8 jours mais en accord avec les résultats de Paxton *et al.* (2007)⁹.

Le principal facteur causant la mortalité des abeilles est l'infection par *Nosema ceranae* avec une mortalité cumulée de 47 % au bout de 20 jours. L'exposition sublétale des abeilles infectées induit des mortalités cumulées plus élevées qu'en l'absence d'exposition, atteignant 82 % pour le fipronil et 71% pour le thiaclopride. Selon les auteurs, ces mortalités sont significativement différentes des mortalités des abeilles infectées mais non exposées. Cependant, le nombre de répétitions et la variabilité des résultats ne sont pas reportés sur la figure.

L'exposition sublétale a été déterminée à partir des DL₅₀¹⁰ de chaque insecticide et confirmée par la mesure quotidienne de sirop contaminé et les faibles taux de mortalité chez les abeilles non infectées. Pour le fipronil, l'exposition journalière correspond à la DL₅₀/158 chez les abeilles non infectées (25,3 ± 4,8 pg/abeille) et à la DL₅₀/148 chez les abeilles infectées (26,9 ± 0,8 pg/abeille). Pour le thiaclopride, l'exposition journalière correspond à la DL₅₀/151 chez les abeilles non infectées (112,1 ± 4,4 ng/abeille) et à la DL₅₀/112 chez les abeilles infectées (152,8 ± 8,7 ng/abeille). Comme il n'est pas précisé si les concentrations en insecticides ont été vérifiées dans les sirops contaminés, les expositions estimées sont considérées comme des doses nominales même si la consommation de sirop a été prise en compte. Selon les auteurs, les consommations totales et les consommations journalières des abeilles non infectées et des abeilles infectées ne sont pas significativement différentes. Si cela semble être le cas pour le fipronil, les incertitudes données pour le thiaclopride semblent indiquer une différence significative, les abeilles infectées consommant davantage de sirop (x1,4) contenant du thiaclopride que les abeilles non infectées.

Le dispositif expérimental ne permet pas de mettre en évidence une relation dose-effet, ni de déterminer une concentration sans effet, c'est à dire une concentration n'induisant aucune augmentation de la mortalité due à *Nosema ceranae*. Il ne permet pas non plus d'analyser la spécificité ou la non-spécificité de l'interaction entre l'infection par *Nosema ceranae* et l'exposition sublétale au fipronil ou au thiaclopride. On ne peut que regretter que d'autres facteurs de stress n'aient pas été étudiés en parallèle comme des agents chimiques autres que des substances néonicotinoïdes ou phénylpyrazoles ou des facteurs de stress nutritionnel. L'infection par *Nosema ceranae* induit un stress énergétique¹¹ qui a été confirmée dans l'étude par une consommation de sirop plus importante chez les abeilles infectées.

Bien que non exclue par les auteurs, l'interaction avec le système de détoxification n'a pas pu être prouvée en mesurant les activités 7-éthoxycoumarine-O-dééthylase (ECOD) et glutathion-S-transférase (GST). Ces activités sont représentatives des enzymes de détoxification de phase I et II, respectivement. La validité de ces indicateurs chez l'abeille domestique n'a cependant pas été discutée.

⁷ Publication citée dans Vidau *et al.* (2011) : Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, Bailon EG, Gonzalez-Porto AV, et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10: 2659–2669.

⁸ Publication citée dans Vidau *et al.* (2011) : Higes M, Martin R, Meana A (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92: 93–95.

⁹ Publication citée dans Vidau *et al.* (2011) : Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I (2007) *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38: 558–565.

¹⁰ DT₅₀ : Durée nécessaire à la dégradation de 50 % de la quantité initiale de la substance.

¹¹ Publication de Mayack et Naugh (2009) citée dans Vidau *et al.* (2011).

Aucune corrélation n'a été trouvée entre le taux de production de spores *in vivo* et les taux de mortalité induits par l'exposition sublétales aux insecticides (Groupe Infecté : $112,1 \times 10^6 \pm 16,7 \times 10^6$ spores/abeille, Groupe Infecté + fipronil : $74,8 \times 10^6 \pm 12,0 \times 10^6$ spores/abeille, Groupe Infecté + thiaclopride : $156,9 \times 10^6 \pm 13,3 \times 10^6$ spores/abeille). Les abeilles exposées au fipronil produisent moins de spores alors que les abeilles exposées au thiaclopride produisent plus de spores.

Les auteurs considèrent que l'évaluation des risques *a priori*, basée sur la DL_{50} , sous-estime les risques notamment pour les abeilles atteintes de maladies et que les résultats montrent des signes d'intoxication chez les abeilles infectées alors que les abeilles non infectées ne montrent pas de signe d'intoxication à la suite d'une exposition similaire.

Il peut être fait remarquer que la plus grande sensibilité d'individus malades est un phénomène qui peut atteindre non seulement l'abeille mais aussi plus généralement toutes espèces non-cibles et l'homme. Par ailleurs, la multi-exposition aux facteurs de stress chimiques, pathologiques ou autres, est une réalité extrêmement complexe qui n'est étudiée dans l'évaluation des risques *a priori* d'aucune réglementation, cette variabilité étant considérée comme prise en compte dans les facteurs de sécurité appliqués.

L'extrapolation de ces résultats obtenus sur des abeilles individuelles dans des conditions contrôlées mais artificielles à l'échelle d'une colonie n'a pas été discutée.

De même, le protocole a été développé par les auteurs pour mettre en évidence des effets liés à une exposition simultanée des abeilles à des substances phytopharmaceutiques et à *Nosema*. L'un de ces deux facteurs (la mortalité liée à *Nosema*) induisant à lui seul une mortalité d'environ 50 % de la population, il peut être considéré que le protocole développé n'est pas totalement pertinent pour mettre en évidence des effets synergiques sur une population.

Enfin, la discussion fait état de certaines publications du spécialiste de référence en Europe pour *Nosema ceranae* sans toutefois citer les résultats de l'analyse multifactorielle réalisée en Espagne (Higes *et al.* 2010¹²; Bernal *et al.* 2011¹³). Ces analyses démontrent une très forte prévalence de l'infection due à *Nosema ceranae* dans les cas de dépopulation et de pertes de colonies parfois associée à *Varroa destructor* et l'absence de lien avec une exposition supposée au fipronil. Des cas de mortalité de colonies en France ont été aussi expliqués par une infection due à *Nosema ceranae* (Borneck *et al.* 2010¹⁴).

CONSEQUENCE SUR L'ÉVALUATION DES RISQUES DE LA PRÉPARATION SONIDO

Les conséquences sur les conclusions de l'évaluation *a priori* des risques liés à l'emploi de la préparation SONIDO, figurant dans l'avis du 16 août 2011, ont été examinées en comparant l'exposition estimée pour l'usage revendiqué à l'exposition dans l'étude de Vidau *et al.* (2011).

- Les concentrations en résidus mesurées dans cette matrice sont toutes inférieures à la limite de quantification (LQ = 0,001 mg/kg) ce qui conduit à une exposition liée à la présence de résidus de thiaclopride dans le pollen de maïs issu de semences traitées avec la préparation SONIDO très faible. De plus, une abeille adulte ne consomme du pollen que pendant la période où elle a une fonction nourricière, et la durée de cette activité est généralement de 10 jours. Enfin, l'exposition par le nectar n'est pas envisagée car le maïs n'est pas une plante nectarifère.

¹² Higes M *et al.* (2010). A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2(2), 243–250.

¹³ Bernal *et al.* (2011). An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain; *Pest Manag Sci* 2011; **67**: 1320–1331

¹⁴ Borneck *et al.* (2010). Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 49(4): 334-336.

- La concentration de thiaclopride testée dans l'étude de Vidau *et al.* (2011) est de 5,1 mg/L. La dose ingérée par les abeilles infectées représente $1/112^{\text{ème}}$ de la DL_{50} pendant 10 jours en ajustant l'exposition théorique par la consommation réelle de sirop.
- Les concentrations dans le pollen de maïs (< 0,001 mg/L) sont au moins 5000 fois inférieures à la concentration à laquelle les abeilles sont exposées dans l'étude (5,1 mg/L). Cette différence d'exposition indique une marge importante entre l'exposition dans la pratique et la dose d'effet en condition de laboratoire.

Il convient également de souligner :

- que, selon la ligne directrice pour les essais, les abeilles doivent provenir de colonies saines possédant une reine. Cette exigence repose sur une appréciation de l'apiculteur et ne fait pas l'objet d'analyse dédiée pour vérifier l'état sanitaire des ruches employées lors des essais ;
- l'extrême difficulté à appréhender les interactions entre des facteurs de stress divers, variables et non maîtrisés (pathogènes, contaminants de l'environnement, etc.) et l'impact potentiel des produits phytopharmaceutiques sur les organismes.

En conclusion, en se fondant sur la réglementation en vigueur et les lignes directrices, sur l'exposition estimée des abeilles en lien avec l'usage revendiqué de la préparation SONIDO (ex-DESIMO) et sur la pertinence relative du protocole développé pour mettre en évidence des effets synergiques sur une population alors qu'un des facteurs induit à lui seul une mortalité d'environ 50 % de la population, les éléments figurant dans l'article de Vidau *et al.* (2011) ne sont pas de nature à remettre en cause les conclusions de l'évaluation de l'Anses sur cette préparation présentées dans l'avis du 16 août 2011.

Il est à noter que la Direction générale de l'alimentation a également demandé à l'Agence, par une saisine en date du 1^{er} septembre 2011, de lui faire savoir comment les travaux rapportés dans l'article de Vidau *et al.* (2011) peuvent s'inscrire sur l'état des connaissances en la matière, par une expertise collective sur le thème des interactions des différents facteurs entre eux et les recommandations qu'il y aurait à faire sur le plan des pratiques apicoles et, le cas échéant, des pratiques agricoles pour limiter les effets considérés. Cette saisine est actuellement en cours d'instruction. Cette saisine est actuellement en cours d'instruction par un Groupe d'expertise collective d'urgence de la Direction d'évaluation des risques.

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Produits phytopharmaceutiques, thiaclopride, *Nosema*