

Recherche de résidus de pesticides dans la cire d'abeille : comparaison entre les cires de corps et d'opercules.

Nathan TENE, Angélique VETILLARD, Michel TREILHOU ; Pres « Université de Toulouse », Centre Universitaire Champollion, Equipe Chimie et Biochimie des Interactions, place de Verdun, 81012, cedex 09

Résumé

La cire d'abeille est un lipide capable de fixer la plupart des polluants d'origine anthropique. Pesticides et autres polluants volatiles peuvent s'y dissoudre de manière durable. Son analyse peut ainsi refléter la qualité de notre environnement. La cire gaufrée est le premier intrant de la ruche. A ce titre, il semble utile de contrôler la présence et le taux de pesticides ou de leur composés de dégradation. Sa réintroduction dans la ruche peut, de ce fait, avoir des conséquences importantes et en premier lieu sur le couvain.

Les travaux d'analyse ont été conduits, sur 40 échantillons de cires, par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem après une extraction liquide-liquide. La cire d'opercule, considérée comme une cire peu contaminée, est généralement privilégiée pour la refonte et le gaufrage. Son analyse montre qu'elle peut contenir certains pesticides comme les piréthrinoïdes en quantité aussi grande que dans la cire de corps. Le thymol, utilisé comme acaricide, a été également détecté en grandes quantités. Compte tenu de l'enjeu de cette molécule dans la lutte contre le varroa, elle fera l'objet d'une thèse afin d'étudier ses effets sur le couvain.

Mots clefs : Pesticides, analyse multi résidus, GC-MS/MS, pyrèthrinoïde, thymol

Introduction

L'impact des pesticides sur les abeilles et donc sur la production apicole ne fait aujourd'hui plus de doute. Les produits de la ruche destinés à la consommation font l'objet de contrôles stricts quant à la présence de pesticides ou de leurs composés de dégradation. La cire, longtemps négligée et pourtant premier intrant de la ruche, est au contact direct de tous les autres produits et acteurs de l'apiculture. Comment les pesticides arrivent-ils dans la cire et quelles sont les répercussions sur la vie de la colonie et sur sa production, en qualité comme en quantité ? Pour commencer à répondre à ces questions, déterminer l'état de la cire est un pré requis : quels pesticides y retrouvons nous, à quelle dose et éventuellement à quelle période ?

En lien avec la société de gaufrage de cire « Apirem » et avec la participation d'apiculteurs et des associations de développement apicole l'ADAPI et l'ADAPRO, nous avons analysé 40 cires de corps ou d'opercules d'origines différentes. La première difficulté a été l'extraction de la cire, puis la détection par spectrométrie de masse qui a nécessité une optimisation de la sensibilité en utilisant le mode en tandem MS/MS. L'étude a concerné une liste préalable de 22 molécules établie en accord avec la profession apicole. 15 de ces substances ont fait l'objet d'une étude approfondie présentée dans cet article.

Matériels et méthodes

Les standards, Thymol, Amitraz, Coumaphos, Tau-Fluvalinate, Fenitrothion, Malathion, Fenthion, Chlorpyrifos ethyl, Procymidone, α et β -Endosulfan, Vinchlozoline, λ -Cyhalothrine, Bifenthrine ont été fournis par la société LGC Promochem (Molsheim, France) et les solvants, acétone, acétonitrile, hexane de qualité Chromasolv[®] ainsi que le florisol par la société Sigma-Aldrich (S^t Quentin Fallavier, France).

1- Extraction de la cire

L'extraction de la cire est inspirée des protocoles publiés par Korta *et al.* (2003) et Jimenez *et al.* (2005). Deux grammes de cires sont fondus dans 50 mL d'hexane puis extraits 2 fois en

ampoule à décanter avec 50 mL d'acétonitrile. La phase acétonitrile est concentrée sous pression réduite à l'évaporateur rotatif, le brut alors obtenu est repris dans de l'acétone, filtré sur cartouche de florisol puis amenée à sec dans un pilulier de 2,5 mL. Le résidu est ensuite dilué dans 100 µL d'acétone.

2- Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse MS₂

Le chromatographe en phase gazeuse est un traceur GC-2000 couplé à un spectromètre de masse à piègeage de charges Polaris-Q de la société Thermo-Fisher (Courtaboeuf ; France). Le chromatographe est équipé d'un injecteur split-splitless utilisé en mode splitless et d'une colonne RTX5-MS (Resteck : L 30 ; diam. interne 0,25 ; film 0,25).

Résultats

Si la plupart des pesticides peuvent être analysés par GC-MS, tous n'ont pas la même réponse à l'ionisation par impact électronique. En effet, le rendement d'ionisation peut être très hétérogène d'une molécule à l'autre, ce qui conduit à une différence de sensibilité de la méthode en fonction de la molécule étudiée. Dans cette première partie de l'étude, nous nous sommes focalisés sur les pesticides les plus adaptés à l'analyse par GC-MS. L'analyse directe (MS1) des chromatogrammes de masse obtenus en courant ionique total (TIC) ne permet pas de repérer les pesticides. En effet, compte tenu des très faibles concentrations de ces molécules et de la complexité de la matrice, il est impossible de les faire émerger du chromatogramme, même en mode d'extraction d'ion. L'alternative fut l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou MS2) qui présente l'avantage d'isoler l'ion d'intérêt initialement noyé dans une matrice trop complexe et de le fragmenter de manière contrôlée en ions caractéristiques. Ainsi, tout en ayant un signal plus faible qu'en MS1, nous améliorons le rapport signal sur bruit : la détection des composés à de très faibles concentrations et en matrice complexe devient alors très efficace.

1- Approche qualitative

La première partie du travail a consisté en une exploration générale des composés. Pour initier cette étude, nous nous sommes focalisés, en premier lieu, sur les molécules d'intérêt pour la profession et citées dans la littérature. Le travail, sur les composés standards, a permis de déterminer le temps d'émergence et les ions caractéristiques de chaque composé (tableau 1). Ces résultats permettront ainsi une détection et une identification des pesticides recherchés par convergence des deux paramètres. Le croisement de ces deux paramètres constitue un avantage par rapport à la chromatographie gazeuse à détection par capture d'électron (ECD), technique plus sensible mais incapable de reconnaître la substance par ses caractéristiques propres.

2- Approche quantitative

Pour chaque molécule nous avons cherché à déterminer le rendement d'extraction (taux de recouvrement) à partir d'une cire contaminée artificiellement. De cette étude, il ressort que dans une analyse multi résidus le rendement d'extraction est rarement excellent, de nombreuses molécules ayant un rendement d'extraction proche de 40 %.

Une courbe de calibration pour chaque molécule a permis de déterminer la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) (Tableau 1).

Parmi les acaricides, seul le fluvalinate a été retrouvé dans les cires de corps comme d'opercules, à des concentrations proches voire inférieures à la LOD. Les taux de thymol retrouvés sont relativement importants, jusqu'à plusieurs dizaines de mg par kg de cire et ceci dans les deux types de cire.

Tableau 1 : liste des pesticides analysés, avec leur temps d'émergence, les ions caractéristiques et la limite de quantification (LOQ). La colonne de droite précise si la substance en question a été retrouvée dans les cires. La 2,4 xylidine est un dérivé de dégradation de l'amitraz. ND = non déterminé. Le – , signifie que la substance n'a pas été repérée. Les m/z soulignés sont les ions principaux.

Substance	Temps d'émergence (min)	Ions caractéristiques (m/z)	Masse molaire	LOQ µg/kg de cire	Retrouvé dans les cires
Thymol	8,43	<u>135</u> , 150	150,2	10	Oui
Amitraz	17,6	<u>162</u> , 293	293,4	10	-
2,4-xylidine (amitraz)	7,14	<u>120</u> , 106	121	10	ND
Coumaphos	18,04	<u>226</u> , 362	362,8	20	-
Tau-Fluvalinate	20,18	<u>250</u>	502,9	20	Oui/ LOD
Fenitrothion	13,21	277, <u>260</u>	277,2	12,5	Oui, traces
Malathion	13,25	<u>173</u> , 125	330,4	10	-
Fenthion	13,36	<u>278</u>	278,3	10	Oui, traces
Chlorpyrifos ethyl	13,38	<u>197</u> , 199	350,6	10	-
Procymidone	14,08	<u>283</u> , 96	284,1	20	-
α-Endosulfan	14,30	<u>241</u> , 195	406,9	12,5	-
Vinchlozoline	15,00	<u>285</u> , 212	286,1	15	-
β-Endosulfan	15,13	<u>241</u> , 195	406,9	12,5	-
Bifenthrine	16,13	<u>181</u> , 166, 165	422,9	5	Oui
λ-cyhalothrine	16,83	<u>181</u> , 197	449,9	10	Oui
cypermethrine	18,79	<u>181</u> , 163	416,3	15	-

La lambda cyhalothrine et la bifenthrine ont été retrouvées dans les deux types de cire, à des doses proches des limites de détection. Enfin, Pour finir quelques traces de fenthion et de fenitrothion ont pu être identifiées mais à des doses non mesurables.

Discussions

Les analyses ont été menées sur 40 cires d'opercules ou de corps issues des mêmes ruchers. Les résultats montrent une présence de pyrèthriinoïdes dans presque toutes les cires à des doses proches de la limite de détection parfois même de la limite de quantification. Au regard de la bibliographie, ces molécules ne semblent pas avoir été souvent identifiées dans les cires. En effet, les principales molécules retrouvées sont la bifenthrine (Talstar, Kiro, ...), le fenitrothion (Fenibel, Broxer, ...), la lambda-cyhalothrine (Karaté, Karachoc, Kung-fu,...). Leur présence, en quantités aussi importantes dans les cires d'opercules que dans les cires de corps, pose la question de leur origine et de leur mode d'introduction dans la ruche. Ces conclusions peuvent nous amener à se poser la question de la période d'utilisation de ce type de pesticides : Il sera alors intéressant de compléter cette étude dans ce sens.

S'agissant des produits de traitement contre le varroa (coumaphos, amitraz), l'analyse n'a pas permis d'en détecter la moindre trace. Ce résultat doit toutefois être nuancé par le fait que, pour cette première étude, les composés de dégradation de l'amitraz n'ont pas été recherchés. Cependant, ce résultat est compatible avec la pratique annoncée des apiculteurs qui ont fourni les cires, aucun d'eux n'ayant utilisé ces produits depuis déjà quelques années. Toutefois, nous avons rencontré dans 27 cas des traces de fluvalinate très discrètes puisque inférieures à la LOD.

L'autre « surprise » de cette étude est le taux de thymol particulièrement présent dans l'ensemble des cires : de 0,1 à 1 mg/kg de cire et jusqu'à 1 g/kg de cire pour un échantillon. Dans certains cas, nous avons rencontré le thymol mais également un de ses isomères. Quelle est l'origine de cet isomère ? Quel est son impact, sur le varroa, sur l'abeille ? Le thymol est considéré comme un bactéricide (Braga *et al.*, 2007 et Del Nobile *et al.*, 2008). La forte concentration de thymol retrouvée dans les cires peut générer des inquiétudes quant à son utilisation dans la lutte contre le varroa. En effet, on peut dès lors se poser la question de son effet sur le couvain d'abeille ?

Conclusions

Les résultats des analyses de ces cires montrent que cette matrice doit faire l'objet d'une surveillance approfondie. Elle est, en effet, le premier intrant dans la ruche et se trouve au contact de tous les acteurs et produits de l'apiculture. La poursuite des analyses de cires par CG-MS et par LC-MS reste donc une priorité. La poursuite des travaux consistera en un élargissement de la liste d'étude, en particulier vers l'imidachlopride, le fipronil, le thiaméthoxam et toutes molécules intéressant la profession ; la simplification et l'amélioration des rendements d'extraction restant un objectif permanent. Cette étude sur les résidus de pesticides trouvera un prolongement dans notre participation au programme « Abeille sentinelle de la santé des écosystèmes ».

Les questions autour du thymol font l'objet d'une thèse visant à étudier l'impact de cette molécule (naturel ou de synthèse) sur le couvain et donc sur la dynamique de population du rucher. En guise de témoins positifs nous envisageons d'utiliser des insecticides larvaires analogues des hormones juvéniles. Il s'agit du métoxyfenozone ou du bufenozone qui provoquent une mue précoce des larves et d'un retardateur de mue tel que le fenoxycarbe ou le pyriproxifène. La toxicité des larvicides envisagés pour cette étude, pourtant actifs chez de très nombreux insectes (Ariri *et al.*, 2006 ; Prabhaker *et al.*, 2007), n'a jamais été étudiée sur l'abeille. En évaluant l'impact du thymol sur les abeilles, en particulier sur le couvain (étude jamais réalisée sur cet insecte) et en explorant par la même occasion l'impact de quelques larvicides sur le développement du couvain, ces travaux devraient permettre de mieux cerner le caractère alternatif du thymol par rapport aux antivarroas traditionnels.

Remerciements

Nous remercions B. Remuaux, gérant de la société Apirem, pour le soutien financier apporté dans le financement d'un ingénieur en CDD sur six mois et pour la confiance accordée à notre jeune équipe. Nous remercions également l'Abeille d'Auvergne, l'Adapi, l'Adapro, et les apiculteurs Daniel Brunel, Jean-Paul Cazaux, Thierry Fedon, Patrick Georges, William Guillot, Dominique Miras, Didier Trouvet. qui ont indirectement cofinancé l'étude en nous confiant l'analyse de leur cire.

Références bibliographiques

- Braga PC., Dal Sasso M., Culici M., Alfieri M. (2007) *Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of Candida albicans*. *Fitoterapia* 78, 396-400
- Del Nobile MA., Conte A., Incoronato AL., Panza O. (2008) *Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films*, *Journal of Food Engineering* 89,1, 57-63
- Jimenez JJ., Bernal JL., del Nozal MJ., Martin MT. (2005), *Residues of organics contaminants in beeswax*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 896-902
- Korta E., Bakkali A., Berrueta LA., Gallo B., Vicente F. and Bogdanov S. (2003), *Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax*, *Analytica Chimica Acta* ; 475, 1-2-3, 97-103
- Prabhaker N., Toscano N.C. (2007) *Toxicity of the insect growth regulators, buprofezin and pyriproxifen to the glassy-winged sharpshooter, Homalodisca coagulata say (Homoptera : Cicadellidae)*, *Crop Protection* , 26, 495-502
- Nakagawa Y., Hattori K., Minakuchi C., Kugimiya S., Ueno T. (2000) *Relationships between structure and molting hormonal activity of tebufenozide, methoxyfenozide, and their analogs in cultured integument system of Chilo suppressalis Walker* ; *Steroids* 65, 117 – 123
- Ariri N., Smaghe G., Lakbar S., Soltani-Mazouni N., Soltani N. (2006) *Effects of pyriproxifen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, Tenebrio molitor*, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84, 55 - 62