

## Une note scientifique sur l'effet de l'acide oxalique sur les larves d'abeilles domestiques

Bethany TERPIN

1, Deja PERKINS

2, Stephanie RICHTER

3, Jennifer Kraft LEAVEY

4, Terry W. SNELL

4, John A. PIERSON

3

1Programme de sciences environnementales, Berry College, Rome, GA, États-Unis

2Programme sur la pêche, la faune et la flore sauvages et la biologie de la conservation, Université d'État de NC, Raleigh, NC, États-Unis

3Georgia Tech Research Institute, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, États-Unis

4School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, 266 4th St., Room 365A CULC, Atlanta, GA 30332-0900, États-Unis

Reçu le 9 novembre 2017 - Révisé le 20 février 2019 - Accepté le 26 avril 2019

Abstract - L'approbation de l'acide oxalique comme traitement contre l'infestation de *Varroa destructor* dans les ruches d'abeilles donne

les apiculteurs une option supplémentaire pour lutter contre ce parasite dévastateur et ce vecteur de maladie, mais les effets de l'acide oxalique

sur le développement des abeilles ne sont pas complètement comprises. Dans cette étude, nous constatons que les doses d'acide oxalique non déclarées

Alors qu'il a été recommandé de n'utiliser l'acide oxalique que pendant les périodes sans couvain, les abeilles adultes sont toxiques pour les larves d'abeilles.

parce qu'il ne pénètre pas dans les bouchons et n'est efficace que pour tuer les acariens, il est tentant de l'utiliser à d'autres

en raison de la pénurie de traitements efficaces. Savoir si l'acide oxalique est toxique pour les larves et

Les doses sont importantes pour les apiculteurs, car ils gèrent la population de leurs colonies tout au long de l'année.

*Varroa destructor* / acide oxalique / abeille domestique / *Apis mellifera*

L'acarien *Varroa destructor* est un pathogène majeur du miel

les abeilles et une des principales causes de l'effondrement des colonies. Les acariens ont une résistance évoluée aux traitements de première génération tels que amitraz, fluvalinate et coumaphos (Sammataro et al. 2005), ce qui a incité les chercheurs à explorer des alternatives telles que l'amitraz, le fluvalinate et le coumaphos.

sous forme d'acide oxalique (OA) dont l'utilisation dans le miel a été approuvée des ruches d'abeilles par l'APE en 2015. L'arthrose est extrêmement toxique pour et est également toxique pour les abeilles adultes à des concentrations élevées (Aliano et al. 2006 ; Martín-Hernández et al. 2007 ; Toomemaa et al. 2010). Certaines données suggèrent que

L'arthrose est toxique pour les larves d'abeilles domestiques (Hatjina et Haristos 2005), probablement en induisant la mort cellulaire (Gregorc et al. 2004), mais l'ampleur de la toxicité de l'arthrose pour les larves n'est pas connu. Il est recommandé d'appliquer l'arthrose à l'automne ou l'hiver lorsque les niveaux de larves sont faibles, mais de nombreux apiculteurs sont si désespérés de réduire la charge des acariens qu'ils l'utilisent à d'autres moments de l'année (communications personnelles).

L'objectif de cette étude est de déterminer la

les taux de mortalité liés à l'arthrose et la concentration létale associée (LC50) pour les larves d'abeilles mellifères. Culture larvaire et toxicité

les essais ont été réalisés en utilisant un protocole de document d'orientation développé pour une exposition répétée (OCDE 2016).

Six groupes de larves ont été testés : un témoin (0,00%) et cinq traitements de concentrations croissantes d'arthrose (0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % et 1,0 %).

Le tableau I décrit la dose par larve ( $\mu\text{g}/\text{larva}$ ) associée à l'arthrose à chaque concentration. L'expérience a été reproduite 12 fois. Deux larves ont été assignées à chaque stade

l'âge et la concentration d'arthrose. Les larves ont été prélevées dans le rucher de Georgia Tech situé sur le toit du Clough Undergraduate Learning Commons à Atlanta, Géorgie (33.775215, - 84.396436) entre mai et Juin 2018. Le premier jour (J1), un greffon chinois a été utilisé pour enlever les larves du peigne. Les larves étaient triées en deuxième, troisième et quatrième stades par l'observation de l'espace occupé par la larve dans la cellule (Human et al. 2013). Les larves ont été placées dans des récipients stériles de 48-plaques de puits contenant 40 µl de régime artificiel composé de 50 % p/v de gelée royale (Stakich Inc., Troy, MI) et Solution à 50 % de sucre/levure à base de D-glucose à 9 % p/v (VWR, Radnor, PA), 9% p/v D-fructose (VWR, Radnor, PA), et 2 % p/v de levure bactérienne (VWR, Radnor, PA) dans de l'eau déionisée. Le greffage a été limité à 60 min durée pour limiter le stress des larves. Les larves ont été cultivées à 35 °C et 90 % d'humidité pendant la durée de l'expérience (D1 à D5). Les larves n'ont pas été nourries au D2 car

Auteur correspondant : J. Leavey,  
jennifer.leavey@biosci.gatech.edu

Editeur de manuscrits : Peter Rosenkranz

Apidologie (2019) 50:363-368 Note scientifique

\* INRA, DIB et Springer-Verlag France SAS, partie de Springer Nature, 2019

DOI: 10.1007/s13592-019-00650-7

Table I. Mortalité des larves d'abeilles mellifères traitées à l'acide oxalique (OA) La mortalité et l'erreur type sont calculées à l'aide de la méthode Kaplan-Meier, avec le test log-rank

données censurées. Les données combinées tiennent compte des deux événements de dosage (D4 et D5)

2ème stade larvaire (jeune)

OA conc.

(%)

D1

Nombre de larves

vivant

D3

Nombre de larves

vivant

D4

Mortalité

D4

StdError

D4

Nombre de

a échoué

D5

Mortalité

D5

StdError

D5

Nombre de

a échoué

Combiné

Mortalité

Combiné

StdError

Combiné

Nombre d'échecs

0.00 24 23 0.0672 0.0216 9 0.1154 0.028 15 0.0603 0.0119 24

0.01 24 23 0.126 0.0296 7 0.2229 0.0372 13 0.1174 0.0167 20

0.05 23 22 0.1558 0.0332 3 0.3154 0.0428 10 0.1616 0.0198 13

0.10 22 22 0.2453 0.0436 7 0.4037 0.0473 8 0.2264 0.0244 15

0.50 22 22 0.4511 0.0598 12 0.5826 0.0544 12 0.3714 0.0332 24

1.00 22 22 0.8753 0.0509 17 0.9621 0.0261 20 0.7238 0.0411 37

3ème stade larvaire (moyen)

OA conc.

(%)

D1

Nombre de larves

vivant

D3

Nombre de larves

vivant

D4

Mortalité

D4

StdError

D4

Nombre de

a échoué

D5

Mortalité

D5

StdError

D5

Nombre de

a échoué

Combiné

Mortalité

Combiné

StdError

Combiné

Nombre d'échecs

0.00 24 24 0.0211 0.0121 3 0.0423 0.0169 6 0.0211 0.007 9

0.01 24 24 0.0211 0.0121 0 0.0504 0.0186 1 0.0239 0.0075 1

0.05 24 24 0.0315 0.0158 1 0.0807 0.0249 3 0.0377 0.0101 4

0.10 24 23 0.0869 0.0307 4 0.1726 0.0399 7 0.0881 0.0176 11

0.50 24 24 0.2229 0.0542 7 0.4895 0.0636 18 0.2498 0.0327 25

1.00 23 23 0.8986 0.055 20 1 0 23 0.7173 0.0455 43

4ème stade larvaire (vieux)

OA conc.

(%)

D1

Nombre de larves

vivant

D3

Nombre de larves

vivant

D4

Mortalité

D4

StdError

D4

Nombre de

a échoué

D5

Mortalité

D5

StdError

D5

Nombre de

a échoué

Combiné

Mortalité

Combiné

StdError

Combiné

Nombre d'échecs

0.00 24 23 0.0074 0.0073 1 0.0294 0.0145 4 0.0123 0.0054 5

0.01 24 22 0.0337 0.0166 3 0.0638 0.0219 4 0.0327 0.0093 7

0.05 24 24 0.0549 0.022 2 0.1152 0.0305 5 0.0575 0.013 7

0.10 23 23 0.0973 0.0318 3 0.2869 0.0493 13 0.1325 0.0216 16

0.50 24 22 0.2204 0.0542 6 0.5786 0.0604 18 0.2902 0.0341 24

1.00 24 22 0.5393 0.0878 9 1 0 22 0.6236 0.0472 31

364 B. Terpin et al.

a servi de période d'acclimatation environnementale. Le jour J3,

les larves ont été contrôlées par une dissection

microscope. Les larves montrant le mouvement de tout

ont été jugés vivants et ont continué l'expérience.

Au D3 et au D4, toutes les larves vivantes ont été nourries avec des aliments artificiels

régime alimentaire avec la concentration d'arthrose appropriée pour leur

groupe de traitement. Le volume de l'alimentation variait selon l'instar

afin de ne pas étouffer les larves. Les larves au stade

deuxième stade ont été nourris 20 µl, troisième stade larvaire

ont été nourris de 50 µl, et les larves de quatrième stade ont été nourries de 100 µl.

Après 24 h, le jour J4, les larves ont été contrôlées pour vérifier leurs mouvements

comme un indicateur de survie. Toutes les larves survivantes étaient

ont à nouveau nourri leur régime de concentration d'arthrose correspondant.

L'expérience s'est terminée sur le D5.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du SAS

Logiciel JMP Pro version 14.1.0. Le logiciel Kaplan-

Méthode Meier avec le test du log-rank et censuré

a été utilisée pour comparer les courbes de survie. Le site

La régression des risques proportionnels de Cox a été utilisée pour

examiner les rapports de risque entre les covariables. Importance

0%

20%

40%

60%

80%

100%

0.00% 0.01% 0.05% 0.10% 0.50% 1.00%

Pourcentage de survie des larves

Concentration d'acide oxalique

Survie instantanée 24 heures après le traitement

2ème Instar

3ème Instar

4ème Instar

Figure 1. Mortalité des larves d'insecte 24 h après l'alimentation initiale (D4). Les graphiques montrent la mortalité 24 h après la première alimentation. Le site

l'axe horizontal (abscisse) est le pourcentage de concentration d'acide oxalique (OA) par rapport au pourcentage larvaire vertical (ordonnée)

la survie. Les barres d'erreur représentent l'erreur type calculée.

0%

20%

40%

60%

80%

100%

0,00% 0,01% 0,05% 0,10% 0,50% 1,00% Pourcentage de survie des larves Concentration d'acide oxalique

Survie instantanée 48 heures après le traitement

2ème Instar

3ème Instar

4ème Instar

Figure 2. Mortalité des larves d'insectes 48 h après la première alimentation (D5) Le graphique représente la mortalité 48 h après la première alimentation. Larves

ont été nourris au D3 et au D4. L'axe horizontal (abscisse) est le pourcentage de concentration d'acide oxalique (OA) par rapport à

pourcentage de survie verticale (ordonnée) des larves. Les barres d'erreur représentent l'erreur type calculée.

Une note scientifique sur l'effet de l'acide oxalique sur les larves d'abeilles domestiques 365

a été définie comme une valeur  $p < 0,05$ . La valeur létale médiane

(CL50) de l'exposition à la dose combinée était avec

des limites de confiance de 95% en utilisant une régression généralisée dose-réponse.

Au total, 423 larves ont été greffées sur D1. Sur D3,

les 412 larves survivantes ont continué à participer à l'étude.

Après 24 heures de traitement (D4), tous les groupes de stades

a montré une diminution de la survie à chaque concentration d'OA

supérieure à 0,05 % (figure 1). Les larves plus âgées étaient

plus résistantes au traitement que les jeunes larves.

Après 48 heures de traitement, les taux de survie des larves dans les

toutes les phases de l'évolution étaient plus basses qu'à 24 h et plus

les larves avaient un taux de survie plus élevé que les larves plus jeunes

(Figure 2).

Taux de mortalité des deuxième, troisième et quatrième stades

Les groupes pour les 12 répliques sont indiqués dans le tableau I, et

La figure 3 illustre les prévisions Kaplan-Meier associées

la mortalité. Alors que les effets du dosage sur l'instar par

Figure 3. Taux de mortalité prévus par Kaplan-Meier selon le stade décrit par les concentrations en pourcentage d'arthrose.

Tableau II. Modèle de risque proportionnel de Cox établissant les rapports de risque de danger associés aux effets aléatoires de l

le dosage simple et double sur la mortalité des stades, l'effet ajouté des concentrations d'arthrose et les effets binaires de l'arthrose

concentration à chaque stade par dosage

Effets de l'instar

Niveau 1 Niveau 2 Rapport de risque Prob > Chisq Bas 95% Haut 95%

4e stade 3e stade 1.0327 0.6819 0.8855 1.2043

2ème stade 3ème stade 1.1098 0.2059 0.9443 1.3043

2e stade 4e stade 1,0747 0,3864 0,9130 1,2651

Effets des pourcentages de concentration en stades et en pourcentage d'arthrose

Durée Rapport de risque inférieur à 95% supérieur à 95%.

OA conc. 1.7625 1.4160 2.1779

Niveau 1 Niveau 2 Rapport de risque Prob > Chisq Bas 95% Haut 95%

4e stade 3e stade 1.0140 0.8595 0.8693 1.1828

2ème stade 3ème stade 1.0780 0.3636 0.9168 1.2675

2ème stade 4ème stade 1.0631 0.4623 0.9031 1.2515

Effets des interactions binaires des pourcentages de concentration des stades et des doses

Durée Rapport de risque inférieur à 95% supérieur à 95%.

OA conc. 3.9993 3.0704 5.2092

Niveau 1 Niveau l2 Rapport de risque Prob > Chisq Bas 95% Haut 95%

4e stade 3e stade 1.2015 0.3044 0.8464 1.7056

2ème stade 3ème stade 2,0618 < 0,0001 1,5050 2,8245

2ème stade 4ème stade 1.7160 0.0003 1.2804 2.2997

366 B. Terpin et al.

ont été établies, les données sur la mortalité ont été ajustées

avec le modèle de risque proportionnel de Cox pour établir

les rapports de risque associés aux aléas

les effets de la dose unique et de la double dose sur la mortalité des stades,

l'effet supplémentaire de la concentration d'arthrose, et la

les effets binaires de la concentration d'arthrose sur chaque stade par

dosage. Le tableau II présente les résultats qui montrent que

tandis que la mortalité au deuxième stade est plus probable par rapport à

les troisième et quatrième instants après le double dosage (voir Risque

Ratio), les valeurs p ne sont pas significatives. En ajoutant la valeur continue

prédicteur des pourcentages d'arthrose et en supprimant le

effets des groupes de stades, la mortalité des larves est 1,76 fois

plus de l'augmentation des pourcentages d'arthrose. Après avoir retiré

les effets de la concentration d'OA à un moment donné, les larves la mortalité par stade reste relativement constante avec des valeurs p insignifiantes. Cependant, l'augmentation des pourcentages d'arthrose indique une probabilité de mortalité supérieure de 3,99 à travers les instars. Le deuxième stade est de 2,06 ( $p < 0,0001$ ) fois plus susceptibles de mourir par rapport au troisième stade et 1,71 ( $p < 0,0003$ ) fois par rapport au quatrième stade.

Le tableau III indique la concentration létale estimée d'arthrose (LC50) pour chaque stade. Les larves des troisième et quatrième stades a montré des valeurs de LC50 plus élevées que la seconde les larves de stade larvaire suivant les tendances du tableau II.

Comme les larves sont protégées dans les cellules de couvain, il est il est peu probable qu'ils soient exposés à la totalité de la concentration de 3 à 5% de l'OA recommandé par l'EPA pour le traitement des par la méthode d'administration de la solution. Le site des gammes de concentration inférieures d'acide oxalique (0,01-1,0 %) utilisée dans cette étude testée pourrait correspondre plus étroitement aux niveaux l'expérience des larves en raison de l'adsorption de l'environnement la matrice de la colonie en réponse à l'écoulement, à la pulvérisation, à la sublimation, ou le transport du pesticide à travers la ruche par le suivi des abeilles adultes. Après une seule exposition, la troisième et les larves de quatrième stade avaient des taux de survie plus élevés dans chaque groupe de traitement par rapport au deuxième stade larvaire indiquant que les larves plus âgées ont une plus grande tolérance pour le pesticide. Une diminution significative de la survie de tous les Les larves 48 h après le traitement ont été documentées.

Les sources de variabilité de la mortalité pourraient résulter de

alimentation consécutive de l'arthrose, moment et ordre de la greffe (groupes de contrôle greffés en premier permettant une plus grande exposition à l'environnement), les larves classées comme vivantes/mortes sans une morbidité intermédiaire définie ou enregistrée, et aucune modification de la composition du régime alimentaire au fur et à mesure que les larves vieillissent. Autre est que si les études sur les pesticides pour adultes sont rapporté en tant que demande orale ou cutanée, aucune distinction n'est Il est prouvé que les larves sont immergées dans la solution contenant la concentration en pourcentage d'arthrose prescrite. Pour en savoir plus : il faut travailler pour déterminer si les taux de mortalité résulte de l'exposition répétée à une double dose de OA, ou simplement la présence d'OA dans le régime alimentaire après une d'intervention. Ce plan expérimental pourrait comprendre l'alimentation intermittente comme 24 h et 72 h.

**Alors que l'acide oxalique au traitement recommandé par l'EPA de 5 ml à 3-5 % d'OA dans l'eau sucrée a été qui se sont révélées sans danger pour les abeilles adultes, cette étude montre que L'acide oxalique est très toxique pour les larves d'abeilles. Le courant fournit un modèle raisonnable de l'exposition des larves à l'OA dans les ruches traitées. Les apiculteurs doivent être conscients que l'utilisation de l'arthrose pour lutter contre les acariens en présence de larves pourrait avoir un effet négatif en aval sur la colonie la taille de la population et la capacité d'hivernage.**

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Tous les auteurs ont contribué de la même manière à cette

Informations sur le financement

Ce travail a été financé par le ministère américain de l'agriculture,

Institut national de l'alimentation et de l'agriculture

n° de subvention 2016-67032-24986.

Une note scientifique sur l'effet de l'acide oxalique sur

les larves d'abeilles

*Varroa destructor* / acide oxalique / *Apis mellifera*

Eine wissenschaftliche Notiz über den Effekt von

Oxalsäure auf Honigbienenlarven.

*Varroa destructor* / Oxalsäure / Honigbiene / *Apis*

*mellifera*

#### RÉFÉRENCES

Aliano, N.P., Ellis, M.D., Siegfried, B.D. (2006) Acute Contact

Toxicité de l'acide oxalique pour le destructeur de *Varroa* (Acari:Varroidae)

et leurs hôtes *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) dans

Essais biologiques en laboratoire. J. Econ. Entomol. 99 (5), 1579–1582

Gregorc, A., Pogacnik, A., Bowen, I.D. (2004) Cell death in honeybee

(*Apis mellifera*) larves traitées à l'oxalique ou au formique

acide. Apidologie. 35 (5), 453–460

Tableau III. Estimation de la concentration létale (CL50) de

l'acide oxalique pour les larves d'abeilles mellifères

Instar

classe

OA prévu

concentration

En bas

95%

Haut de page

95%

2ème 0,649 0,553 0,759

3ème 0,972 0,853 1,118

4ème 0,959 0,838 1,105

Une note scientifique sur l'effet de l'acide oxalique sur les larves d'abeilles domestiques 367

Hatjina, F., Haristos, L. (2005) Effets indirects de l'acide oxalique administré par méthode de ruissellement sur le couvain d'abeilles. J. Apic.

Rés. 44 (4), 172-174

Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., et al. (2013) Divers des méthodes standard pour la recherche sur *Apis mellifera*. J.

Apic. Rés. 52 (4), 1-53

Martín-Hernández, R., Higes, M., Pérez, J.L., Nozal, M.J., Gómez, L., Meana, A. (2007) Short term negative effect of oxalic acid in

*Apis mellifera iberiensis*. Span. J. Agric. Rés. 5 (4), 474-480

Document d'orientation de l'OCDE (2016) sur l'abeille mellifère (*Apis mellifera*)

Test de toxicité larvaire, exposition répétée, série sur les tests et l'évaluation n° 239. Organisation pour la coopération économique et le développement. ENV/JM/MONO(2016)34

Sammataro, D., Untalan, P., Guerrero, F., Finley, J. (2005) Le la résistance des acariens varroa (*Acari : Varroidae*) aux acaricides

et la présence d'estérase. Int. J. Acarol. 31 (1), 67-74

Toomemaa, K., Martin, A.-J., Williams, I.H. (2010) L'effet de différentes concentrations d'acide oxalique dans l'eau et le saccharose solution sur les acariens Varroa et les abeilles domestiques. Apidologie. 41 (6), 643-653

Note de l'éditeur Springer Nature reste neutre vis-à-vis de en ce qui concerne les revendications de compétence dans les cartes publiées et les

les affiliations.

368 B. Terpin et al.