



HAL
open science

Contamination chimique de matrices apicoles au sein de ruchers appartenant à des structures paysagères différentes

Olivier Lambert

► **To cite this version:**

Olivier Lambert. Contamination chimique de matrices apicoles au sein de ruchers appartenant à des structures paysagères différentes. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22302 . tel-00833765

HAL Id: tel-00833765

<https://theses.hal.science/tel-00833765>

Submitted on 13 Jun 2013

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.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 592

Thèse

Présentée à Nantes

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : ÉCOLOGIE

soutenue le 05 décembre 2012

Olivier LAMBERT

**Contamination chimique de matrices apicoles au sein de ruchers
appartenant à des structures paysagères différentes**

Directeur de thèse : Frédéric Delbac, *Professeur, Université Blaise Pascal Clermont Ferrand*

Co-directeur de thèse : Hervé Pouliquen, *Professeur, Oniris Nantes*

Examineurs : Monique L'Hostis, *Professeur, Oniris Nantes*

Gérard Arnold, *Directeur de Recherche, CNRS Gif sur Yvette*

Joseph Baudet, *Maître de Conférences, Université de Nantes*

Rapporteurs : Luc P. Belzunces, *Directeur de Recherche, INRA Avignon*

Philippe Berny, *Professeur, VetAgro Sup Campus Vétérinaire Lyon*

LABORATOIRE « MICROORGANISMES : GÉNOME ET ENVIRONNEMENT »

UMR CNRS 6023, ÉQUIPE INTERACTIONS HÔTES-PARASITES

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 592

Thèse

Présentée à Nantes

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : ÉCOLOGIE

soutenue le 05 décembre 2012

Olivier LAMBERT

**Contamination chimique de matrices apicoles au sein de ruchers
appartenant à des structures paysagères différentes**

Directeur de thèse : Frédéric Delbac, *Professeur, Université Blaise Pascal Clermont Ferrand*

Co-directeur de thèse : Hervé Pouliquen, *Professeur, Oniris Nantes*

Examineurs : Monique L'Hostis, *Professeur, Oniris Nantes*

Gérard Arnold, *Directeur de Recherche, CNRS Gif sur Yvette*

Joseph Baudet, *Maître de Conférences, Université de Nantes*

Rapporteurs : Luc P. Belzunces, *Directeur de Recherche, INRA Avignon*

Philippe Berny, *Professeur, VetAgro Sup Campus Vétérinaire Lyon*

LABORATOIRE « MICROORGANISMES : GÉNOME ET ENVIRONNEMENT »

UMR CNRS 6023, ÉQUIPE INTERACTIONS HÔTES-PARASITES

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monique L'Hostis pour m'avoir ouvert les portes « de la faune sauvage » en mars 2000 et de me faire confiance depuis. Monique, si ma prédilection, et vous le savez, va pour les oiseaux, vous avez su éveiller ma curiosité de naturaliste et me convertir aussi au monde de l'abeille ou plutôt des abeilles grâce notamment à ce travail ; je ne serai jamais un grand fervent de l'apiculture mais le rôle de l'abeille dans les écosystèmes me passionne et la situation délicate dans laquelle les pollinisateurs se trouvent mérite l'attention de tous. Je vous remercie également ou plutôt je vous félicite d'avoir pu me pousser une première fois à faire un master 2 et une seconde fois à réaliser ce travail de thèse ; je crains malheureusement que votre ténacité ne parvienne à me conduire sur les ruchers d'Ouessant ! J'espère enfin avoir apporté ma contribution à « l'édifice faune sauvage » que vous avez porté, supporté et érigé, et je souhaite poursuivre tout ce travail avec autant de réussite et de pugnacité. Merci à vous.

Je remercie chaleureusement Luc P. Belzunces et Philippe Berny pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je souhaite que ce travail puisse susciter de nouvelles collaborations.

Je remercie Gérard Arnold et Joseph Baudet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci M. Arnold d'avoir suivi ce travail depuis le début et d'avoir exprimé aussi souvent que nécessaire vos conseils avisés. Merci M. Baudet pour toutes ces heures naturalistes à vos côtés et pour cette passion que vous savez si bien communiquer.

Je tiens à remercier Frédéric Delbac de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir accepté la direction de cette thèse. Bien que ma présence au laboratoire ait été fantomatique, j'ai particulièrement apprécié la qualité de nos échanges et tout l'esprit convivial qui règne dans l'équipe « Interactions Hôtes-Parasites » du LMGE. Que ce travail de thèse soit le début d'une fructueuse collaboration scientifique apicole !

Je remercie également Hervé Pouliquen d'avoir pris la co-direction de cette thèse. Un grand merci Hervé, pour m'avoir initié à l'écotoxicologie, pour ton soutien lors de ce travail mais également pour les travaux que nous réalisons ensemble.

Merci à Chantal Thorin pour ses conseils en statistiques et pour ses encouragements.

Un merci tout particulier à Mélanie Piroux : bonne humeur, rigolade, complémentarité et efficacité au travail sont nos maîtres mots. Merci aussi, Mélanie pour ton aide statistique, cartographique et photographique dans ce manuscrit.

Je remercie toutes les personnes qui ont permis la réalisation de cette étude, les apiculteurs, tous les membres de l'équipe, les laboratoires, les financeurs et une mention toute particulière pour Jean-Marie Barbançon.

Une pensée personnelle pour Anne, Martin et Adélie qui sont mes rayons de soleil quotidiens même si je ne leur dis pas assez (leur ai-je déjà dit d'ailleurs ?) !

Une autre pensée pour Pa, Man et Mère,

Une dernière pensée émue pour Père : tu es chaque jour et chaque instant à mes côtés ; tu me manques terriblement mais j'avance en pensant à toi « en avant toute, repos ailleurs, CQFD » ! Je sais que tu serais fier de ton petit fils...

Dans un registre plus léger, une pensée pour Bob Sinclar et Tatiana...

Bob, agent secret français endurci et séducteur, s'adressant à son contact au Mexique, la splendide Tatiana « J'ai un fond de sensibilité que je n'arrive pas à étouffer. Si, si, si, si. Ça va peut être vous faire sourire mais quand je vois une abeille [...]. Lorsque je vois une abeille porter le pollen de fleurs en fleurs et perpétuer ainsi la vie, j'en ai presque les larmes aux yeux ! »



AVANT -PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE) de l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (Oniris), en parallèle à mon activité professionnelle (biologiste/directeur du CVFSE) et sous la co-direction du Professeur Frédéric Delbac du Laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement », UMR CNRS 6023, Equipe Interactions hôtes-parasites de l'Université Blaise Pascal à Aubière, et du Professeur Hervé Pouliquen de l'Unité de Pharmacologie et Toxicologie, Département Biologie, Pathologie et Science de l'Aliment, d'Oniris.

Il s'agit de la valorisation scientifique d'une étude de terrain menée au CVFSE entre 2007 et 2010, utilisant l'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) comme témoin de la pollution de l'environnement sur un transect paysager en Pays de la Loire. Cette étude avait bénéficié des soutiens financiers de la Direction Générale des Politiques Economique, Européenne et Internationale (Ministère chargé de l'Agriculture), du Conseil Régional des Pays de la Loire, du Conseil Général de Loire Atlantique, de Nantes Métropole, d'Oniris et du Groupe Pullman par l'Association Bee My Friend. Cette étude a pu être menée par ailleurs grâce au soutien technique d'apiculteurs volontaires qui ont accepté d'ouvrir leurs ruchers deux années consécutives (2008-2009) pour la réalisation des prélèvements des matrices apicoles étudiées. Les prélèvements ont été effectués par du personnel d'Oniris, impliqué dans l'activité du CVFSE : Monique L'Hostis (Professeur de Parasitologie-Zoologie Appliquée, responsable de la Formation Approfondie en Apiculture-Pathologie apicole/Diplôme Inter-Ecoles Oniris-ENVA (DIE)), Isabelle Guilberteau (Sociologue au CVFSE durant l'étude, formation DIE 2007-2008), Suzanne Bastian (Maître de Conférences en Maladies Réglementées et Zoonoses, formation DIE 2007-2008), Bénédicte Pouleur (Stagiaire Master 2, formation DIE 2009-2010), Jean-Michel Allard (Technicien à l'Unité de Pharmacologie et Toxicologie), et moi-même (formation DIE 2007-2008).

Ce travail de thèse a fait l'objet de trois publications scientifiques ([Wiest et al., 2011](#) ; [Lambert et al., 2012a](#) ; [Lambert et al., 2012b](#)), de plusieurs communications scientifiques, orales et affichées, nationales et internationales, et de nombreuses communications de

transfert ([Annexe 1](#)). Trois articles scientifiques sont actuellement soumis ([Lambert *et al.*, soumis](#) ; [Mouret *et al.*, soumis](#) ; [Piroux *et al.*, soumis](#)) et des articles supplémentaires sont en cours de réalisation ou en projet.

RÉSUMÉ/ABSTRACT

Contamination de matrices apicoles au sein de ruchers appartenant à des structures paysagères différentes

Depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, l'industrialisation, l'urbanisation croissante, les transports et les pratiques agricoles ont entraîné une contamination généralisée des écosystèmes et des modifications profondes dans la composition et la structure des paysages. Ces changements majeurs induisent des perturbations physiologiques et comportementales des organismes et ont des effets négatifs sur la biodiversité. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) est au cœur de cette problématique : 1/ les colonies d'abeilles déclinent dramatiquement depuis quelques années en Europe et aux Etats-Unis, et 2/ les abeilles sont reconnues comme d'excellentes sentinelles pour évaluer la contamination environnementale grâce à leurs caractéristiques physiologiques et biologiques. C'est dans ce contexte, que des abeilles, du miel et du pollen récoltés dans l'Ouest de la France ont été analysés pour évaluer leurs contaminations et la présence dans l'environnement d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de plomb, de pesticides et de médicaments vétérinaires. Les échantillons ont été prélevés dans 18 ruchers de contextes paysagers différents (ville, bocage, culture et insulaire) sur 4 périodes (printemps, début d'été, milieu d'été et début d'automne) en 2008 et en 2009. Les résultats d'analyses toxicologiques mettent en évidence des sensibilités différentes en fonction du polluant environnemental, de la matrice étudiée, de la période de prélèvements et du contexte paysager. En dépit de ces différences, le plus souvent propres à chaque rucher, notre étude montre une contamination généralisée des matrices apicoles quels que soient le paysage et la période considérés. Même si les concentrations mesurées sont généralement faibles, cette pression par les xénobiotiques s'ajoute à, voire amplifie l'action des nombreux autres stressors environnementaux qui menacent la survie des abeilles en général.

Mots clés : Abeille mellifère, miel, pollen, contamination, plomb, HAP, pesticides, paysage

Contamination of beehive matrices from apiaries located in different landscape structures

Since the middle of the twentieth century, industrialization, growing urbanization, transports and agricultural practices led to an ecosystem overall contamination and to profound modifications in landscape structure and composition. Those major changes cause physiological and behavioral damages on organisms and have adverse effects on biodiversity. Honey bee (*Apis mellifera*) is in the central point of this problematic: 1/ bees colonies are recently dramatically declining both in Europe and USA, and 2/ bees are recognized as appropriate sentinels to assess the environmental contamination due to their physiological and biological characteristics. In this context, honeybees, honey and pollen sampled from West France, were analyzed to monitor their contamination and the presence in the environment of polycyclic aromatic hydrocarbons, lead, pesticides and veterinary drugs. Samples were collected in eighteen apiaries from different landscape context (urban, rural-grassland, rural-cultivated and island) during four periods (spring, early summer, middle summer, early autumn) over 2008 and 2009. Toxicological analysis results show different sensitiveness according to the environmental pollutant, the studied matrix, the period and the landscape context. Despite such differences, most often specific to each apiary, our study shows an overall contamination of beehive matrices in all landscapes and during all periods. Even if the measured concentrations are generally low, this xenobiotic pressure is added to, even increases, the effect of many other environmental stressors which threaten the survival of bees in general.

Keywords: honeybee, honey, pollen, contamination, lead, PAH, pesticides, landscape

SOMMAIRE DETAILLE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 - PROTOCOLE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE ET DONNÉES PRÉLIMINAIRES.....	15
1.1. Choix des ruchers et des colonies prélevées.....	17
1.2. Plan d'échantillonnage	20
1.2.1 Matrices apicoles prélevées	20
1.2.2. Périodes de prélèvements.....	23
1.2.3. Protocole général	25
1.2.4. Laboratoires partenaires et analyses réalisées	26
1.3. La caractérisation paysagère de chaque aire de butinage	28
1.3.1. Types paysagers de l'étude	28
1.3.2. Caractérisation paysagère des ruchers	28
1.4. Confrontation des données d'analyse paysagère et des données palynologiques	39
Résumé	39
Abstract	40
1. Introduction.....	41
2. Materials and methods	42
2.1. Study area, sampling sites and biological matrices of hive sampling	42
2.2. Landscapes analysis.....	43
2.3. Palynological analysis	44
2.4. Data analysis.....	44
3. Results	45
3.1. Landscape data.....	45
3.2. Palynological data.....	47

3.3. Classification of apiaries by land-cover data of the foraging area	48
3.4 Classification of apiaries by palynological data	49
3.5 Co-inertia analysis	50
4. Discussion	52
4.1. Land-cover and landscapes	52
4.2. Family profiles of pollen and landscapes	53
4.3. Land-cover, family profiles of pollen and landscapes	54
5. Conclusion	56
Acknowledgements	56
References	56
1.5. Conclusion concernant le protocole général et les données préliminaires	61
CHAPITRE 2 - CONTAMINATION DE TROIS MATRICES APICOLES PAR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)	63
2.1. Contexte des travaux.....	65
2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : les abeilles, le miel et le pollen, sentinelles des contaminants chimiques environnementaux.....	68
Résumé	68
Abstract	69
1. Introduction.....	69
2. Materials and methods	71
2.1. Study area, sampling sites and biological matrices of hive sampling	71
2.2. Reagents and chemicals	72
2.3. Instruments and equipments	72
2.4. Sample preparation	73
2.5. GC-MS/MS measurement	73
2.6. Performances	74
2.7. Statistical analysis.....	74

3. Results and discussion	75
3.1. Evolution of contamination	75
3.2. Exposure and sources of contamination of the different matrices	78
3.2.1. Contamination in the different matrices.....	78
3.2.2. Sources of contamination of the hive matrices	79
3.3. Exposure and sources of contamination around the different apiary sites.....	80
4. Conclusions.....	82
Acknowledgment.....	83
References.....	83
2.3. Données complémentaires	87
2.3.1. Interprétation des résultats du dosage des HAPs à 3, 4 et 5 cycles aromatiques	87
2.3.1.a. Contexte et objectifs	87
2.3.1.b. Résultats et discussion	88
2.3.1.c. En résumé	96
2.3.2. Les ruchers en ville	96
2.3.2.a. Contexte des analyses	96
2.3.2.b. Résultats et discussion	97
2.3.2.c. En résumé	101
2.4. Conclusion concernant la contamination des matrices apicoles par les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	102
CHAPITRE 3 - CONTAMINATION DE TROIS MATRICES APICOLES PAR LE PLOMB (Pb).....	105
3.1. Contexte des travaux.....	107
3.2. Les abeilles, le miel et le pollen, sentinelles de la contamination environnementale par le plomb (Pb).....	110
Résumé	110
Abstract	111
1. Introduction.....	111

2. Materials and methods	112
2.1. Sampling sites and biological matrices.....	112
2.2. Reagents and chemicals	114
2.3. Instruments and equipments	114
2.4. Sample preparation.....	114
2.5. Absorption atomic measurement	115
2.6. Performances	115
2.7. Statistical analysis.....	115
3. Results and discussion	116
3.1. Contamination of different matrices for all apiaries and all sampling periods.....	117
3.2. Lead contamination according to landscape context of apiaries and to sampling periods	118
3.2.1. In bee matrix	118
3.2.2. In honey matrix	120
3.2.3. In pollen matrix	121
3.3. Lead contamination in apiaries according to matrices, to landscape context and to sampling periods	123
4. Conclusions.....	123
Acknowledgment.....	124
References.....	124
3.3. Données bibliographiques de la contamination des matrices apicoles par le plomb et par d'autres métaux (Cd, Zn ,Cu, Fe et Hg).....	128
3.3.1. Dans la matrice miel.....	128
3.3.2. Dans la matrice abeilles.....	132
3.3.3. Dans la matrice pollen.....	134
3.4. Conclusion concernant la contamination des matrices apicoles par le plomb.....	138

CHAPITRE 4 - CONTAMINATION DE TROIS MATRICES APICOLES PAR LES SUBSTANCES À USAGES
PHYTOSANITAIRES ET VÉTÉRINAIRES 141

4.1. Contexte des travaux.....	143
4.2. Analyse multi-résidus de 80 contaminants environnementaux dans les miels, les abeilles et les pollens par une procédure d'extraction suivie par de la chromatographie liquide et gazeuse couplée à de la détection par spectrométrie de masse.....	146
Résumé.....	147
Abstract.....	147
1. Introduction.....	148
2. Materials and method.....	151
2.1. Materials.....	151
2.2. Sample collection.....	152
2.3. Sample preparation.....	152
2.3.1. Honey.....	153
2.3.2. Honeybees.....	153
2.3.3. Pollens.....	154
2.3.4. Reconstitution of the extract.....	154
2.4. LC-MS/MS.....	154
2.5. GC-ToF.....	155
2.6. Method validation.....	157
2.6.1. Method validation plan.....	157
2.6.2. Method validation parameters.....	157
2.6.3. Quantification.....	158
3. Results and discussion.....	160
3.1. Method optimization.....	160
3.1.1. Sample extraction.....	160
3.1.2. LC-MS/MS.....	161
3.1.3. GC-ToF.....	163
3.1.4. Calibration and matrix effect.....	164

3.2. Method validation and performance	166
3.3. Application to real samples	175
4. Conclusion	178
Acknowledgment.....	178
References.....	179
4.3. Présence généralisée de résidus de produits chimiques dans les matrices apicoles de ruchers appartenant à différents paysages de l’Ouest de la France.....	181
Résumé	181
Contexte :	181
Méthodologie/Résultats :.....	182
Conclusions/Portée :	182
Abstract	182
Background:.....	182
Methodology/Findings:	183
Conclusions/Significance:	183
Introduction.....	183
Materials and Methods	184
Study sites	184
Sample collection	185
Sample preparation, analysis and method performance.....	186
Statistical analyses.....	189
Results	189
Multiple contaminant residues detected in honeybee, honey and pollen matrices	189
Main detected contaminant residues and their concentrations in the three beehive matrices	192
Contamination according to the landscape context and to the sampling period.....	194
Discussion	195
Pesticide and veterinary drug contamination of beehive matrices	195

Main contaminants in beehive matrices	196
Other contaminants and implications for bee colony health	197
Contamination according to the landscape context and to the sampling period.....	199
Acknowledgments	200
References.....	200
4.4. Analyses statistiques complémentaires de données de contamination par les résidus des traitements agricoles et vétérinaires dans les matrices apicoles	206
4.4.1. Résultats toxicologiques et jeu de données.....	206
4.4.2. Classifications hiérarchiques sur les données initiales.....	207
4.4.3. Description des profils de contamination dans la matrice miel.....	211
4.4.4. Sensibilité des matrices envers les variables paysage et période.....	215
4.4.5. Bilan des analyses statistiques	218
4.5. Comparaison des pratiques d'utilisation des substances à usages phytosanitaires et vétérinaires et de la contamination des matrices apicoles des 18 ruchers de l'étude.....	219
4.5.1. Contexte général et objectif.....	219
4.5.2. Réalisation	221
4.5.2.a. Les questionnaires.....	221
4.5.2.b. La récolte des informations.....	222
4.5.3. Résultats et discussion	223
4.5.3.a. Superficie couverte par les enquêtes.....	223
4.5.3.b. Traitements réalisés en 2008 sur les aires de butinage des 18 ruchers de l'étude ...	225
4.5.3.c. Molécules utilisées en 2008 sur les aires de butinage des 18 ruchers de l'étude	227
4.5.4. Bilan des enquêtes	230
4.6. Conclusion concernant la contamination des matrices apicoles par les pesticides et médicaments vétérinaires.....	231
CHAPITRE 5 - DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	233
5.1. Les matrices apicoles comme sentinelles de la contamination environnementale	235

5.2. Le contexte paysager et la période, des facteurs de variation de la contamination des matrices apicoles.....	239
5.3. Evaluation de la toxicité pour l’Homme des résidus détectés dans les miels prélevés	243
5.4. Contamination multiple des matrices apicoles par les pesticides : quels effets potentiels sur les abeilles ?	245
5.5. Contaminations chimiques et biologiques importantes : quelles implications sur la santé des abeilles ?	250
5.6. Conclusion et perspectives.....	253
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	255
ANNEXES.....	293
Annexe 1. Liste des publications scientifiques, des communications et des co-encadrements de stages réalisés dans le cadre de ce travail de thèse.....	295
Annexe 2. Résultats bruts des dosages des pesticides dans les échantillons d’abeilles, de miel et de pollen par rucher et par période.....	303
Annexe 3. Profils de contamination dans la matrice abeilles	321
Annexe 4. Questionnaire à destination des professionnels agricoles afin de récolter les informations relatives à l’utilisation des substances à usages phytosanitaires.....	323
Annexe 5. Evaluation de la toxicité pour l’Homme des résidus de traitements phytosanitaires et vétérinaires retrouvés dans les échantillons de miel collectés dans le cadre de cette étude.....	325
Annexe 6. Etude de terrain de la prévalence de 12 agents infectieux dans 18 ruchers de l’Ouest de la France	327



A close-up photograph of a wooden beehive. The image shows several bees on the surface of the hive, which is made of light-colored wood. The bees are positioned on a horizontal wooden beam. The background is slightly blurred, showing more of the hive structure. The text "INTRODUCTION" is overlaid in the center of the image in a bold, black, sans-serif font.

INTRODUCTION

A travers des millénaires d'évolution, les abeilles mellifères ont colonisé la quasi-totalité des continents, traversant jusqu'à nos jours, et avec succès, de multiples bouleversements géologiques, climatiques et écologiques.

Les abeilles sont des arthropodes mandibulés de la classe des Insectes. Elles font partie de l'ordre des Hyménoptères, du sous-ordre des Apocrites, de l'infra-ordre des Aculéates (porte-aiguillon), et de la super-famille des Apoïdes (*Apoidea*) qui regroupe près de 20 000 espèces (Le Conte, 2002) (Figure 1).

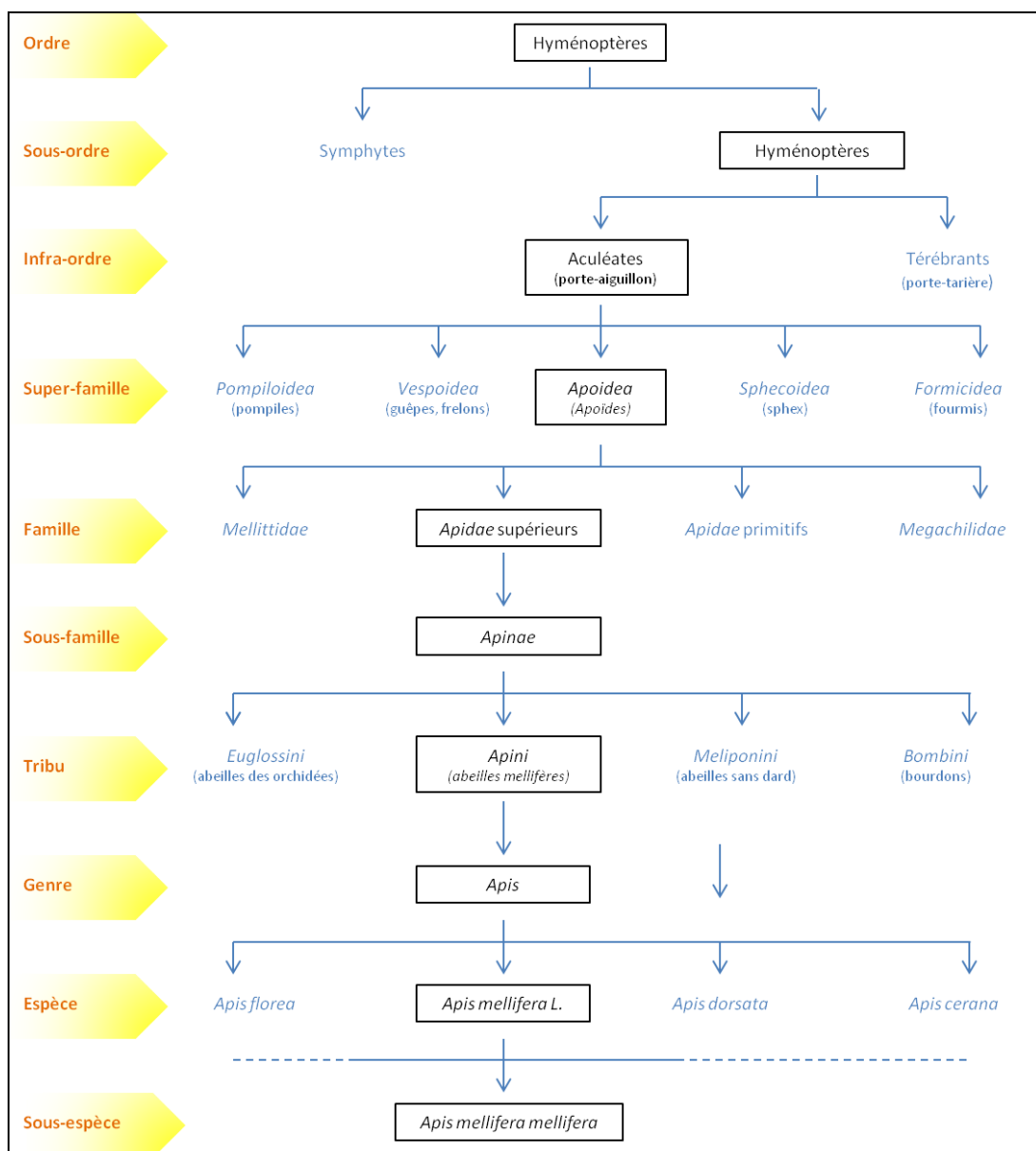


Figure 1. Classification systématique des abeilles mellifères (d'après Le Conte, 2002).

Les Apoïdes sont caractérisés par la présence de poils sur la cuticule, par une alimentation à base de nectar et de pollen et, par conséquent, par la présence d'une longue langue et d'un système de collecte-transport du pollen sur la dernière paire de pattes ou sur la face ventrale de l'abdomen. Dans cette super-famille, les abeilles appartiennent à la famille des *Apidae* supérieurs et à la sous-famille des *Apinae*. Cette sous-famille comprend plus de 1 000 espèces de quatre tribus regroupant l'ensemble des abeilles à corbeilles (« corbiculate » bees), et présentant des caractères morphologiques, moléculaires et comportementaux distincts et spécifiques : la tribu *Euglossini* des abeilles des orchidées (5 genres différents), la tribu *Bombini* des bourdons (genre *Bombus*), la tribu *Meliponini* des abeilles sans dard (8 genres dont *Melipona* et *Trigona*), et la tribu *Apini* des abeilles dites mellifères comprenant un unique genre, *Apis*.

Les abeilles se sont développées parallèlement aux plantes à fleurs, les angiospermes, qui sont apparues au cours du Crétacé (145,5 à 65,5 Ma), il y a environ 132 millions d'années. L'analyse fossile d'angiospermes datées à environ 112 millions d'années a permis d'identifier des fleurs mâles et des fleurs femelles séparées, d'où la nécessité de disposer à cette époque d'agents pollinisateurs pour assurer la fécondation. Alors que les plus anciens fossiles d'hyménoptères, trouvés dans de l'ambre, seraient datés d'environ 100 millions d'années, les premières abeilles seraient apparues lors de l'Eocène (55,8 à 33,9 Ma) et les premiers membres du genre *Apis* lors de l'Oligocène supérieur (33,9 à 28,4 Ma) (Baker et Chmielewski, 2003 ; Engel, 2006 ; Engel *et al.*, 2009 ; Kotthoff *et al.*, 2011). Jusque ces dernières années, les plus anciens spécimens d'abeilles fossiles, du genre *Apis*, provenaient uniquement de l'Ancien Monde (Kotthoff *et al.*, 2011) : Europe datant de l'Oligocène-Miocène (33,9 à 23,03 Ma), Asie datant du Miocène (23,03 à 7,25 Ma), Afrique de l'Est (spécimen de l'espèce actuelle *Apis mellifera*) et Malaisie (construction de cellules de l'espèce actuelle *Apis cerana*) datant du Pléistocène (2,59 à 0,126 Ma). Très récemment, une découverte a permis d'identifier une forme originelle d'abeille mellifère dans des schistes argileux du Nevada (Stewart Valley, Etats Unis) datant du Miocène moyen (Engel *et al.*, 2009). Ce spécimen constitue la première mention de présence ancienne d'abeilles mellifères sur le continent américain, et remet en question toutes les théories biogéographiques et évolutionnistes des abeilles à corbeilles (« corbiculate » bees) dont l'aire de répartition originelle était supposée strictement liée à l'Ancien Monde. Il est probable que les abeilles étaient largement répandues à travers l'Europe et l'Asie pendant l'Eocène primaire et moyen et qu'elles aient été capables de se disperser à travers l'Ouest de l'Amérique du Nord comme

d'autres espèces animales ou végétales à cette époque (Engel *et al.*, 2009). Durant le Miocène inférieur, l'Ouest de l'Amérique du Nord avait un climat tempéré chaud semblable à celui du Paléartique, et était entouré de zones très arides représentant une barrière hostile et donc un isolement géographique de ces abeilles (*Apis nearctica*). Cette frontière climatique expliquerait notamment la présence de l'Abeille mellifère à l'Ouest de l'Amérique du Nord sans qu'elle ait pu coloniser les autres régions d'Amérique. La disparition progressive des connexions terrestres au niveau du détroit de Béring aurait entraîné l'isolement de certaines abeilles (*Apis nearctica*) et les changements climatiques du Miocène supérieur auraient eu des impacts importants sur la végétation et la faune du Néogène (23,03 à 2,588 Ma), induisant la disparition de cette espèce en Amérique du Nord, comme ce fut le cas pour plusieurs espèces animales et végétales (Kürschner *et al.*, 2008). Au cours du Miocène inférieur sur le Paléartique, quatre grandes lignées d'abeilles se sont alors distinguées (Starr, 1998) : une lignée d'abeilles naines (*Apis florea* Fabricius), une lignée d'abeilles géantes (*Apis dorsata* Fabricius), une lignée d'abeilles orientales (*Apis cerana* Fabricius) et une lignée d'abeilles occidentales (*Apis mellifera* Linnaeus). Ces groupes représentent encore actuellement les quatre espèces du genre *Apis*. Au cours du Pliocène, alors que l'expansion d'*Apis cerana* est limitée par des zones arides, la lignée *Apis mellifera* connaît une première vague d'expansion de l'Asie méridionale vers l'Ouest dans les Balkans et autour de la Méditerranée, et vers le Sud de l'Afrique.

Les fortes glaciations du Pléistocène limitèrent l'expansion d'*Apis mellifera* en Europe notamment, et c'est au cours de l'Holocène, suite à la première période de réchauffement post-glaciaire, que les voies d'expansion se dessinent définitivement : une vague colonisant toute l'Afrique du Sud, une vague vers le Moyen Orient et l'Europe de l'Est et une vague colonisant l'Afrique du Nord, la péninsule ibérique puis tout le reste de l'Europe et l'Asie occidentale. L'aire géographique d'extension couvre ainsi les continents européen, africain et asiatique à l'exception du Sud-Est qui comporte à lui seul les trois autres espèces (*Apis florea* F. et *Apis dorsata* F. en Asie du Sud-Est, et *Apis cerana* F. de l'Afghanistan au Japon). *Apis mellifera* L. est donc la seule espèce occidentale, sa large répartition et ses traits comportementaux faisant de cette espèce, la plus utilisée dans l'apiculture moderne. Sous l'influence des conditions environnementales (climat, biogéographie, végétation) et en fonction de ses voies d'expansion, *Apis mellifera* a ainsi évolué en plus d'une vingtaine de sous-espèces différentes regroupées en quatre lignées évolutives différentes (Garnery *et al.*, 1992 ; Palmer *et al.*, 2000 ; Franck *et al.*, 2000 ; Franck *et al.*, 2001 ; de la Rúa *et al.*, 2001). Chaque

sous-espèce a acquis des caractéristiques génétiques, morphologiques, écologiques et comportementales spécifiques : la lignée M des sous-espèces ouest-méditerranéennes (*A. m. mellifera*, *A. m. iberica*), la lignée A des sous-espèces africaines (*A. m. intermissa*, *A. m. scutellata*, *A. m. lamarckii*, ...), la lignée C des sous-espèces nord-méditerranéennes (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, ...) et la lignée O (*A. m. caucasica*, *A. m. syriaca*, ...) des sous-espèces turques et caucasiennes (Figure 2).

<p>Lignée A (sous-espèces africaines) :</p> <p><i>Apis mellifera intermissa</i> Buttel-Reepen, 1906. <i>Apis mellifera sahariensis</i> Baldensperger, 1922. <i>Apis mellifera lamarckii</i> Cockerell, 1906. <i>Apis mellifera adansonii</i> Latreille, 1804. <i>Apis mellifera jemenitica</i> Ruttner, 1975. <i>Apis mellifera littorea</i> Smith, 1961. <i>Apis mellifera scutellata</i> Lepeletier, 1836. <i>Apis mellifera monticola</i> Smith, 1961. <i>Apis mellifera capensis</i> Escholtz, 1821. <i>Apis mellifera unicolor</i> Latreille, 1804.</p>
<p>Lignée C (sous-espèces nord-méditerranéennes)</p> <p><i>Apis mellifera carnica</i> Pollman, 1879. <i>Apis mellifera ligustica</i> Spinola, 1806. <i>Apis mellifera sicula</i> Montagano, 1911. <i>Apis mellifera cecropia</i> Kiesenwetter, 1860. <i>Apis mellifera macedonica</i> Ruttner, 1987.</p>
<p>Lignée M (sous-espèces ouest-méditerranéennes)</p> <p><i>Apis mellifera mellifera</i> Linnaeus, 1758. <i>Apis mellifera iberica</i> Goetze, 1964.</p>
<p>Lignée O (sous-espèces turques et caucasiennes)</p> <p><i>Apis mellifera syriaca</i> Buttel-Reepen, 1906. <i>Apis mellifera anatoliaca</i> Maa, 1953. <i>Apis mellifera adami</i> Ruttner, 1975. <i>Apis mellifera cypria</i> Maa, 1879. <i>Apis mellifera meda</i> Skorikov, 1929. <i>Apis mellifera caucasica</i> Gorbatchev, 1916. <i>Apis mellifera armeniaca</i> Skorikov, 1929.</p>

Figure 2. Lignées évolutives et sous-espèces géographiques d'*Apis mellifera* (d'après Garnery *et al.*, 1992 ; Palmer *et al.*, 2000 ; Franck *et al.*, 2000 ; Franck *et al.*, 2001 ; de la Rúa *et al.*, 2001 ; Clément *et coll.*, 2006).

Des multiples représentations dans l'art (rupestres et autres), aux vénération des différentes religions pour les produits de l'abeille, et de la cueillette au Néolithique, aux ruchers de plusieurs centaines de colonies au XXI^e siècle, les abeilles mellifères ont une histoire intimement liée à l'Homme depuis près de 10 000 ans. Le témoignage le plus ancien de cette relation serait celui du Cueva de la Araña en Espagne, une peinture rupestre du

néolithique (vieille de 7 000 à 8 000 ans) représentant une silhouette humaine à la cueillette de miel sauvage, accrochée en haut d'un arbre d'une main et tenant de l'autre un panier tressé pour transporter la récolte. Par ailleurs, la présence fréquente de cires d'abeille dans des céramiques retrouvées sur des sites néolithiques laisse penser que la récolte de rayons de miel devait être une activité spécialisée et largement répandue. Les premiers vrais signes de domestication de l'abeille remonteraient à 2400 av. J.-C., des peintures égyptiennes montrant un rucher, des hommes « apiculteurs » devant des ruches, ou encore des scènes d'extraction de miel. C'est à cette époque donc que l'Homme a franchi des étapes importantes dans la récolte de miel, et bien que pratiquée encore de nos jours par certaines tribus, l'activité de cueillette a été progressivement remplacée par l'élevage apicole avec la civilisation : de la chasse-cueillette, à la confection de ruches disposées près des habitats et au déplacement des ruchers en fonction des ressources pour augmenter la production de miel. La domestication de l'Abeille mellifère se généralise et se perfectionne au cours des premiers siècles de notre ère en Europe, en Asie et en Afrique, sans connaître toutefois un véritable essor. Ce n'est qu'aux XVII^e et XVIII^e siècles que de nouvelles étapes sont franchies. Premièrement, les connaissances sur l'abeille s'améliorent avec l'arrivée du microscope et l'avènement de l'entomologie. Un premier traité sur les abeilles est publié en 1625 par F. Cesi et F. Stelluti, et les premières descriptions précises de l'anatomie interne et externe et de la biologie de l'abeille sont réalisées, notamment grâce aux travaux de J. Swammerdam (1637-1680) et de R.A. Ferchault de Réaumur (1683-1757). Deuxièmement, l'élevage apicole et les abeilles de la lignée M connaissent une phase d'expansion considérable, les colons amenant avec eux des ruches aux Amériques et en Océanie. Ainsi, le genre *Apis* est réintroduit en Amérique du Nord lors des colonisations majeures du XVII^e siècle après une absence depuis le Pliocène. A partir des abeilles importées, des colonies sauvages d'*Apis mellifera mellifera* s'installent et permettent son extension rapide aussi bien en Amérique du Nord, qu'en Australie et en Nouvelle Zélande, impactant parfois de façon significative les espèces végétales ou animales locales (Sugden et Pyke, 1991 ; Hury, 1997 ; Gross et Mackay, 1998 ; Goulson, 2003a ; Paini, 2004). Le XIX^e siècle voit s'affronter deux courants apicoles, le fixisme et le mobilisme. Le fixisme laisse les abeilles construire librement leurs rayons à l'intérieur de la ruche (le plus souvent un panier), comme elles l'auraient fait dans la nature, mais ceci impose de détruire la structure complète lors de la récolte. Le mobilisme correspond à une apiculture moderne reposant sur des modifications majeures de la structure de la ruche et la présence de cadres mobiles pour organiser, contrôler le développement de la colonie et améliorer les rendements, ce système ayant déjà été utilisé par les grecs il y a 2 500 ans. En quelques

années, les ruches à cadres se sont perfectionnées (C. Paix de Debeauvoys en 1844, L.L. Langstroth en 1851, puis C. Dadant) jusqu'à l'utilisation de feuilles de cires gaufrées pour guider les abeilles (J. Mehring en 1857) et la création du premier extracteur de miel pour préserver les cires (F. Von Hrushka en 1865). Durant cette même période, la connaissance scientifique sur *Apis mellifera* franchit une nouvelle étape avec les travaux de K. von Frisch sur la perception sensorielle et le langage de cette espèce, la « danse » des abeilles. En parallèle à ces avancées scientifiques et techniques, et dans un souci d'amélioration de la production apicole, les apiculteurs se penchent sur les qualités spécifiques de chaque sous-espèce d'*Apis mellifera* dès la fin du XIX^e siècle. Si les critères géographiques imposent une répartition naturelle des sous-espèces dans l'Ancien Monde, cette sélection devient un enjeu important aussi bien lors des implantations sur les continents américains et australiens, que pour les élevages en Europe notamment. Rapidement à cette sélection de sous-espèces, se sont ajoutés (i) les sélections à l'intérieur même de chaque sous-espèce, ne retenant que les meilleures colonies comme sources de reines et de mâles pour former les futures colonies et (ii) les croisements entre une ou plusieurs sous-espèces pour créer et fixer sur le long terme des colonies présentant les caractères les plus intéressants de chacune des sous-espèces (Clément et coll., 2006). Les sélections, les hybridations, les importations et exportations de ces abeilles à travers le Monde, ajoutées aux croisements sauvages et non contrôlés, ont accéléré les flux de gènes entre des populations d'abeilles différenciées et les effets négatifs sont multiples : sensibilité accrue aux variations environnementales locales du biotope, pollution génétique voire extinction des races pures natives, ... (de la Rúa et al., 2009).

A une échelle spatiale et une vitesse plus importantes, la seconde moitié du XX^e siècle et le début du XXI^e siècle signent la modification profonde de l'environnement des ruchers et constituent très vraisemblablement un nouveau bouleversement pour les abeilles mellifères et l'apiculture.

Les premières perturbations sont associées aux systèmes modernes de production agricole. Pour répondre à un souci de rendement et d'optimisation de la production par rapport à la surface cultivée, l'intensification agricole a entraîné une altération significative des paysages et de la biodiversité associée (Mc Laughlin et Mineau, 1995 ; Sotherton, 1998 ; Stoate et al., 2001 ; Robinson et Sutherland, 2002 ; Reidsma et al., 2006 ; Stoate et al., 2009). L'augmentation de la taille des parcelles cultivées et l'homogénéisation des cultures en sont deux aspects essentiels. Il en résulte une réduction qualitative et quantitative significative des prairies, des haies, des friches et des bords de champs utilisés par de nombreuses espèces

comme des refuges, des corridors écologiques ou des zones d'alimentation (Öckinger et Smith, 2007). Cette fragmentation des habitats naturels et de l'hétérogénéité des paysages a contribué à la baisse de la biodiversité dans les zones agricoles (Weibull *et al.*, 2003), et aux perturbations des fonctions écologiques remplies, d'une part, par les prédateurs naturels des insectes déprédateurs des cultures et, d'autre part, par les insectes pollinisateurs (Steffan-Dewenter *et al.*, 2002 ; Kremen *et al.*, 2002 ; Tschardtke *et al.*, 2005). Dans ces zones de cultures intensives, et plus particulièrement les zones céréalières, les assolements ont souvent été simplifiés et la place laissée aux plantes entomophiles, cultivées (luzerne, colza, ...) ou non, est généralement très limitée, réduisant drastiquement les ressources alimentaires de certaines espèces. De même, si les cultures mellifères représentent des ressources intéressantes et attractives pour les abeilles, leur floraison est généralement limitée et la raréfaction des plantes sauvages (de haies, de bosquets ou de bords de champs) des paysages de monocultures amène également à des périodes pauvres en ressources alimentaires et sensibles pour les abeilles (Holzschuh *et al.*, 2007).

En parallèle à cette modification profonde des paysages qui a constitué le premier bouleversement dans l'environnement apicole, l'utilisation massive des pesticides a impacté et impacte encore significativement la biodiversité (Ware, 1980 ; Freemark et Boutin, 1995) et en l'occurrence la santé de l'abeille (Crane et Walker, 1983 ; Greig-Smith *et al.*, 1994 ; Barnett *et al.*, 2007). D'après Robinson et Sutherland (2002), suite à l'introduction du premier herbicide hormonal (methoxone) dans les années 1940, 37 matières actives différentes étaient autorisées en usage agricole en 1955, contre 136 en 1970 et 344 en 1997. Même si les nouveaux pesticides sont moins rémanents et plus efficaces que les organochlorés, nécessitant de moins grandes quantités de matière active, le nombre d'applications et la durée des périodes de traitements ont augmenté ; les effets sur les abeilles sont par conséquent plus insidieux. Les cas d'intoxications aiguës, rapportés notamment avec les organophosphorés appliqués à dose élevée dans les années 80-90 (Greig-Smith *et al.*, 1994), sont remplacés par des cas d'intoxications chroniques sublétales provoquant des troubles comportementaux et physiologiques (Decourtye *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2011 ; Belzunces *et al.*, 2012 ; Henry *et al.*, 2012). Ces troubles sans précédent qui ont touché l'Europe dans les années 1990-2000, coïncident avec l'arrivée sur le marché des insecticides systémiques, efficaces à très faible dose et utilisés en enrobage de semences végétales. L'utilisation généralisée de ces nouveaux insecticides constitue vraisemblablement le deuxième bouleversement dans le paysage apicole.

Le troisième facteur impactant significativement la santé d'*Apis mellifera* concerne les agents infectieux et en particulier l'acarien ectoparasite *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010). Cet acarien était présent à l'origine dans le Sud-Est de l'Asie chez *Apis cerana*, un équilibre s'étant établi entre le parasite et son hôte. Son passage chez *Apis mellifera* dans les années 60, vraisemblablement suite à l'introduction en Asie de cette espèce plus rentable qu'*Apis cerana*, est le point de départ d'une dispersion mondiale, favorisée et accélérée par les transhumances et les nombreux échanges internationaux. L'Europe et les Etats-Unis sont touchés respectivement au début et à la fin des années 80. Ajouté à son action spoliatrice qui affaiblit les colonies, *Varroa destructor* est le vecteur de nombreux agents infectieux de l'abeille (virus de la paralysie aiguë, virus de Cachemire, virus du couvain sacciforme, virus des ailes déformées) et est à l'origine de la perte de plusieurs centaines de milliers de colonies à travers le Monde. Si *Varroa destructor* est actuellement considéré comme une des plus sérieuses menaces pour *Apis mellifera* (de la Rúa *et al.*, 2009 ; Rosenkranz *et al.*, 2010), d'autres agents infectieux sont autant de facteurs qui contribuent à l'affaiblissement et aux mortalités des colonies : les bactéries agents des loques européenne et américaine (Forsgren, 2010 ; Genersch, 2010), les microsporidies du genre *Nosema* (Chen *et al.*, 2009 ; Fries, 2010 ; Higes *et al.*, 2010a), et les différents virus (virus de la paralysie aiguë, de la paralysie aiguë variant israélien, de Cachemire (de Miranda *et al.*, 2010), de la cellule noire de reine, de la paralysie chronique (Ribière *et al.*, 2010), des ailes déformées (de Miranda et Genersch, 2010) ou de la maladie du couvain sacciforme).

La modification des paysages, les pesticides et les agents infectieux, *Varroa destructor* en tête, ont un impact fort sur la santé des abeilles, l'intégrité et la survie des colonies, et sont probablement à l'origine de l'importante diminution du nombre de colonies exploitées à la fois en Europe (- 26,5 % entre 1961 et 2007) et aux Etats-Unis (- 49,5 % sur la même période) depuis 50 ans (Potts *et al.*, 2010b ; vanEngelsdorp et Meixner, 2010) (Figure 3). Cette baisse conséquente se confirme irrémédiablement depuis une quinzaine d'années en Europe, avec des pertes hivernales importantes et des ruches vidées de leurs abeilles, et depuis moins de dix ans aux Etats-Unis, phénomène qualifié de « Colony Collapse Disorder » (CCD). Bien que ces deux phénomènes soient différents, du fait des spécificités de chacune des deux apicultures, les dépérissements ne semblent pas liés à une cause unique mais plutôt à de multiples causes, et impliquent l'action conjointe de plusieurs stressseurs environnementaux (Bruneau et Burget, 2008 ; vanEngelsdorp *et al.*, 2009 ; Ellis *et al.*, 2010 ; Genersch *et al.*, 2010 ; Neumann et Carreck, 2010 ; vanEngelsdorp et Meixner, 2010).

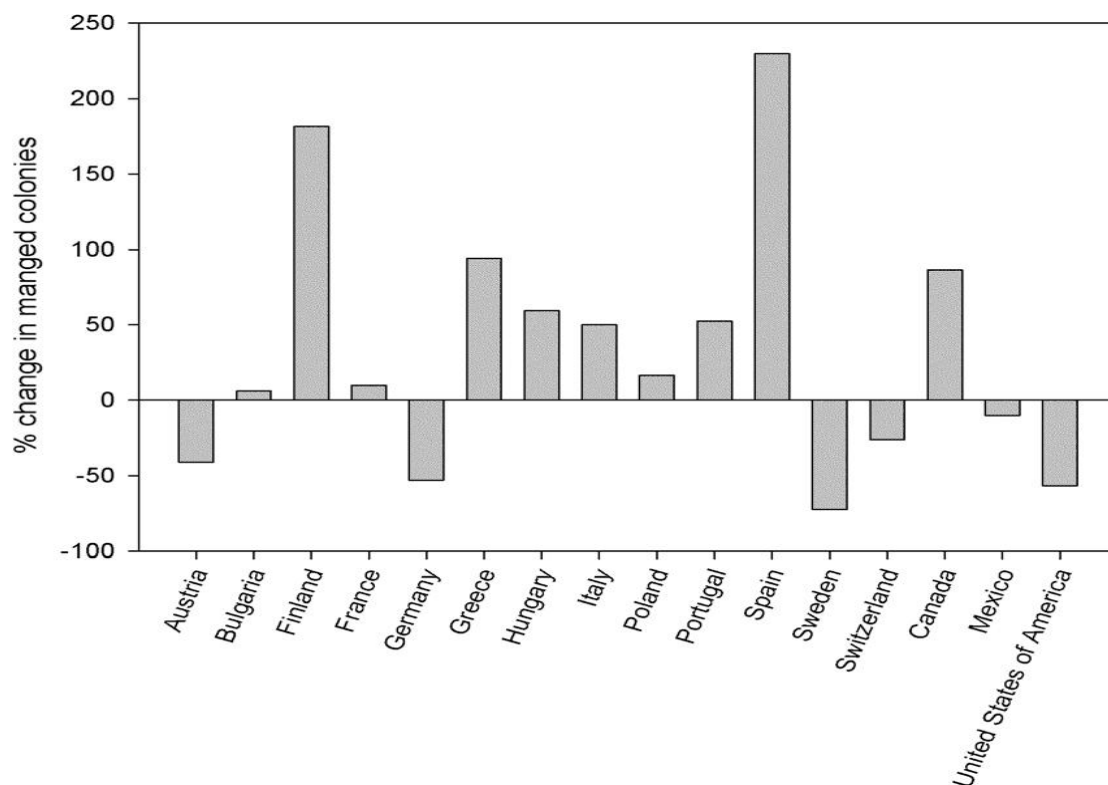


Figure 3. Evolution du nombre de colonies d’abeilles exploitées entre 1961 et 2006 dans différents pays d’Europe et d’Amérique du Nord (d’après vanEngelsdorp et Meixner, 2010).

C’est dans ce contexte de crise apicole et plus généralement environnementale, que le Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l’Alimentation Nantes Atlantique) a mis en place une étude prospective (2007-2010) pour évaluer la qualité de l’environnement en Pays de la Loire en utilisant les matrices apicoles comme indicateurs biologiques. De nombreuses études ont en effet montré que les abeilles et les matrices associées (miel et pollen) pouvaient être utilisées comme sentinelles de la contamination de l’environnement par les xénobiotiques (Celli et Maccagnani, 2003 ; Porrini *et al.*, 2003 ; Ghini *et al.*, 2004 ; Devillers et coll., 2005 ; Ponikvar *et al.*, 2005 ; Sabatini, 2005 ; Bogdanov, 2006), l’Abeille mellifère (*Apis mellifera*) possédant les caractéristiques propres d’une espèce sentinelle (Lagadic *et al.*, 1998 ; Elliott *et al.*, 2011) :

- en tant que consommateur primaire, l’abeille se situe en début de chaîne alimentaire et constitue ainsi le reflet direct de la contamination des végétaux par « simples » transferts de polluants. Elle possède une aire de répartition mondiale tout en ayant une aire de butinage limitée, communément fixée entre 1,5 et 3 kilomètres de rayon autour la ruche (Janssens *et al.*, 2006). Elle peut ainsi donner

des images ponctuelles de la contamination, et comparables sur une échelle géographique très vaste. Il est également possible de déterminer précisément les ressources trophiques et les sites de butinage utilisés, par l'étude des pollens rapportés à la ruche et de cibler ainsi les zones et sources de contamination. L'Abeille mellifère survit dans différents types de milieux plus ou moins anthropisés et peut être introduite sur des sites spécifiques puisque la ruche est facilement déplaçable : elle offre à ce titre la possibilité d'évaluer la contamination de paysages très variés, tant que ceux-ci disposent de ressources alimentaires suffisantes au développement et à la survie de la colonie ;

- chaque colonie d'abeilles produit un nombre conséquent d'individus qu'il est possible de prélever en quantité respectable. De plus, étant une espèce domestique qui se comporte comme une espèce sauvage, l'Abeille mellifère offre le double avantage (i) d'être élevée dans une structure artificielle donc déplaçable, manipulable, observable et contrôlable (mesure de l'activité, évaluation des comportements et de la dynamique de croissance, ...) et (ii) de prospecter l'environnement immédiat, donc d'être représentative des autres pollinisateurs en matière de qualité générale d'un milieu ;
- son corps recouvert de poils retient et transporte aisément les résidus atmosphériques lors de ses vols de prospection ;
- la biologie et la physiologie de l'abeille sont désormais bien connues, facilitant les interprétations de toute nouvelle étude, notamment sur les effets des contaminants biologiques et chimiques.

Pour répondre à l'objectif principal de l'étude et afin d'évaluer plus finement la contamination générale des matrices apicoles et ses effets potentiels sur la santé de l'abeille, plusieurs axes de travail ont été déclinés : 1/ une analyse paysagère fine des aires de butinage autour de chaque rucher partenaire pour classer chacun d'entre eux par grand type paysager, 2/ des analyses toxicologiques des abeilles, du miel et du pollen récoltés pour évaluer leur contamination par des polluants environnementaux, 3/ des analyses écopathologiques pour évaluer la contamination des abeilles par les agents infectieux, et un suivi sanitaire des colonies, 4/ des analyses palynologiques du pollen et du miel pour définir les ressources alimentaires et les éventuelles sources de contamination, et 5/ des enquêtes sur les pratiques d'utilisation des pesticides sur les aires de butinage étudiées.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit fait suite à cette étude de terrain et s'attache plus précisément à caractériser et comparer la contamination chimique de trois matrices apicoles, abeilles butineuses (*Apis mellifera*), miel et pollen de trappe, en fonction du type paysager et de la période de prélèvements. Ce travail doit répondre notamment aux interrogations suivantes :

- 1- pour chaque type de polluant environnemental (hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux lourds ou pesticides), quels sont les « patterns » de distribution des différentes molécules recherchées ?
- 2- laquelle des trois matrices apicoles prélevées peut être considérée comme la meilleure sentinelle et serait à préconiser pour évaluer la contamination environnementale par ce type de polluant ?
- 3- existe-t-il un lien entre le degré de contamination des matrices apicoles et l'appartenance à un type paysager et dans ce cas quel paysage serait plus contaminé par ce type de polluant ?
- 4- existe-t-il un lien entre le degré de contamination des matrices apicoles et la période d'échantillonnage et dans ce cas à quel moment les matrices apicoles seraient les plus contaminées ?

Pour répondre à ces questions, le travail s'articule autour de cinq chapitres. Le premier chapitre présente le contexte méthodologique général de l'étude et notamment l'attribution de chacun des ruchers à un des quatre types paysagers suivis : urbain, bocage, cultures ou insulaire. Les trois chapitres suivants constituent le corps principal de ce travail de thèse et détaillent la contamination des abeilles, du miel et du pollen par (i) les hydrocarbures aromatiques polycycliques, (ii) le plomb, et (iii) les substances à usages phytosanitaires et vétérinaires. Chacun de ces chapitres se décline en trois axes majeurs : la présentation générale du ou des contaminants et le contexte bibliographique associé, la valorisation scientifique des analyses toxicologiques et des résultats sous forme d'articles scientifiques, et l'exploitation de données complémentaires et bibliographiques afin de mieux cerner les « patterns » de contamination des matrices apicoles. Le cinquième et dernier chapitre reprend les acquis fondamentaux obtenus au cours de ces travaux et s'ouvre sur une discussion générale où l'accent est mis plus particulièrement sur les effets des contaminations chimiques et biologiques pour l'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) et l'implication potentielle de la contamination généralisée de l'environnement pour les abeilles sauvages.

A close-up photograph of a honeybee on a white flower, with the text overlaid on the image. The bee is positioned in the center, facing the flower's center. The background is a soft, out-of-focus blue sky. The text is centered and reads:

**CHAPITRE 1 - PROTOCOLE GÉNÉRAL DE
L'ÉTUDE ET DONNÉES PRÉLIMINAIRES**

1.1. Choix des ruchers et des colonies prélevées

Afin d'évaluer la contamination des matrices apicoles par les polluants environnementaux étudiés et d'établir une éventuelle spécificité, d'une part en fonction de la localisation du rucher et plus précisément du paysage, d'autre part en fonction de la période de l'année, des prélèvements ont été effectués régulièrement dans une cohorte de dix-huit ruchers à caractéristiques paysagères différentes.

Des études récentes ont montré que la contamination des matrices apicoles variait en fonction du contexte paysager des aires de butinage des abeilles*, notamment en fonction du degré d'anthropisation (Tuzen *et al.*, 2007 ; Yarsan *et al.*, 2007 ; Codreanu *et al.*, 2009a ; Perugini *et al.*, 2009 ; Bilandžić *et al.*, 2011 ; Perugini *et al.*, 2011 ; van der Steen *et al.*, 2011). A la mise en place de l'étude, l'hypothèse, que des structures paysagères différentes autour des ruchers pouvaient refléter des conditions d'utilisations ou de rejets de contaminants de l'environnement différentes et donc des profils de contamination des matrices apicoles spécifiques, a été retenue. Afin de vérifier cette hypothèse et dans l'objectif de notre travail, le premier enjeu a donc été de sélectionner des ruchers installés dans des zones à caractéristiques paysagères différenciées en région des Pays de la Loire.

Les ruchers partenaires ont été choisis sur la base du volontariat suite à un appel lancé au niveau régional et relayé par les structures apicoles locales (Groupement d'Intérêt Economique, section apicole des Pays de la Loire ; Fédération des Apiculteurs de Bretagne et des Pays de la Loire ; Syndicats des Apiculteurs de Loire Atlantique (44), du Maine et Loire (49), de Mayenne (53), de Sarthe (72) et de Vendée (85) ; Associations Sanitaires Apicoles Départementales ; Groupements de Défense Sanitaire Départementaux). De nombreux apiculteurs soucieux de la situation difficile des abeilles, tant sur le plan national que mondial (Genersch *et al.*, 2010 ; Moritz *et al.*, 2010) et conscients des enjeux liés à la recherche dans ce domaine, ont manifesté leur souhait de participer à cette étude. Les choix définitifs ont été faits en fonction :

- de la localisation géographique des ruchers disponibles. Cette étude étant financée pour partie par les collectivités territoriales locales (Conseil Régional des Pays de la Loire, Conseil Général de Loire Atlantique, Nantes Métropole), des contraintes liées à la répartition géographiques des ruchers ont été prises en compte : la moitié des ruchers dans le département de la Loire Atlantique (dont la moitié d'entre eux située dans l'agglomération

*Dans la suite du texte, sauf mention particulière, le terme abeille(s) se rapportera à l'Abeille domestique *Apis mellifera* 17

nantaise) et l'autre moitié répartie dans les quatre autres départements de la Région des Pays de la Loire ;

- du nombre de colonies allouées à l'étude. Au sein de chaque rucher, les stratégies de butinage des abeilles sont variables et plutôt spécifiques à chaque colonie, les butineuses récoltant le nectar et le pollen sur différentes ressources florales réparties autour du rucher (Bruneau et Colin, 2006 ; Holzschuh *et al.*, 2007 ; Figure 4). Afin d'obtenir une image aussi fidèle que possible de la contamination chimique des ruchers, un nombre conséquent de colonies devait être prélevé, (i) sans pour autant réduire nos chances de trouver des ruchers de taille suffisamment importante, et (ii) tout en restant réaliste dans la charge de travail de terrain. Ainsi pour chaque rucher, huit ruches ont été sélectionnées au hasard pour y prélever les échantillons durant la totalité de l'étude (2008 et 2009). Les apiculteurs se sont engagés à tenir à disposition ce nombre de huit colonies et à les renouveler en cas de pertes (colonie morte, ruche détruite, ...). L'objectif de l'étude étant d'utiliser les matrices apicoles comme sentinelles de la contamination de l'environnement proche des ruchers (notamment par comparaison des molécules utilisées sur le terrain et des molécules retrouvées lors des analyses) et donc de pouvoir rapprocher une éventuelle contamination de sa source, seules les colonies sédentaires ont été retenues, les colonies transhumant n'étant pas sentinelles d'un seul site géographique.

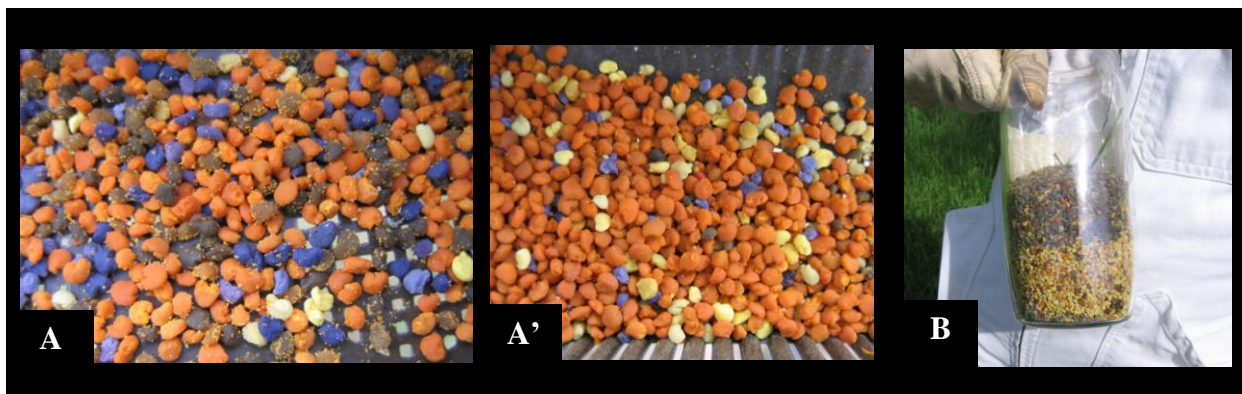


Figure 4. Illustration des stratégies de butinage spécifiques des colonies d'un même rucher sur une même période par les pelotes de pollen récoltées (A et A' : contenu de trappes à pollen de deux colonies du même rucher ; B : bocal contenant une superposition des récoltes différentes de pollen de deux colonies d'un même rucher) ; (photos CVFSE/Oniris, 2009).

Seize ruchers (identifiés de A à P) ont donc été sélectionnés en mars 2008 selon ces critères. Deux ruchers supplémentaires, situés l'un sur l'île d'Yeu (ruche IY ; Pays de la Loire) et l'autre sur l'île d'Ouessant (rucher IO ; Bretagne), ont participé à l'étude en tant que ruchers de paysages insulaires (Figure 5).

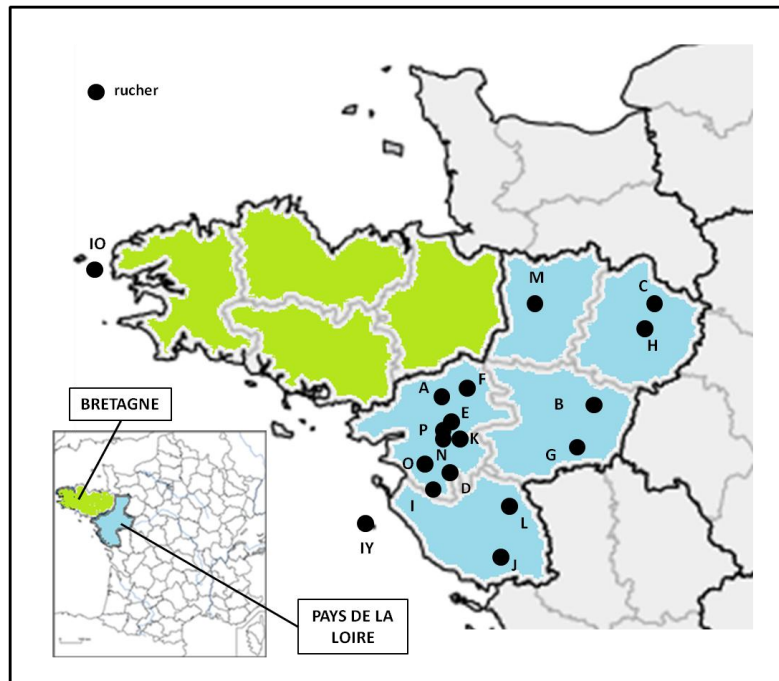


Figure 5. Localisation géographique des 18 ruchers partenaires (point noir) identifiés de A à P pour les ruchers continentaux, et IO et IY, pour les ruchers insulaires.

Les deux ruchers insulaires ont des caractéristiques propres :

- l'aire de butinage des abeilles est limitée à la superficie de l'île (2332 ha et 1558 ha respectivement pour l'île d'Yeu et l'île d'Ouessant), ce qui est inférieur aux aires mesurées pour les colonies continentales, les distances moyennes de prospection alimentaire variant de quelques centaines de mètres à plusieurs kilomètres (Beekman and Ratnieks, 2000 ; Steffan-Dewenter et Kuhn, 2003) ;

- la flore de ces îles est spécifique avec une large proportion de plantes sauvages adaptées aux conditions climatiques difficiles en particulier sur l'île d'Ouessant (vents violents, embruns, couche de terre réduite, ...). La pression anthropique est le plus souvent faible voire même très limitée pour l'île bretonne.

Ces facteurs font que la contamination chimique de la flore et des matrices apicoles liée aux activités humaines y est supposée comme faible par rapport à celle des ruchers continentaux.

1.2. Plan d'échantillonnage

1.2.1 Matrices apicoles prélevées

Le plan d'échantillonnage a été établi afin d'obtenir une image la plus fidèle possible des contaminants ramenés à la ruche par l'abeille et d'appréhender leurs éventuels transferts au sein même de la ruche. Pour chaque rucher et à partir des huit colonies, les matrices ont été choisies dans cet objectif :

- une matrice **abeilles butineuses**. Les caractéristiques biologiques et physiologiques de l'abeille font qu'elle est considérée comme une véritable sentinelle pour évaluer la pollution environnementale (Kevan, 1999 ; Devillers et Pham-Delègue, 2002 ; Celli et Maccagnani, 2003 ; Porrini *et al.*, 2003 ; Ghini *et al.*, 2004 ; Sabatini, 2005 ; Balayiannis et Balayiannis, 2008 ; Chauzat *et al.*, 2011 ; Perugini *et al.*, 2011) : aire de butinage connue, grande mobilité et corps recouvert de poils retenant les particules atmosphériques lors des vols, élevage et prélèvements relativement aisés, physiologie connue, ... Les abeilles butineuses ont été prélevées sur la planche d'envol des huit ruches sélectionnées à l'aide d'un aspirateur à main (Figure 6). Chaque colonie reflète des conditions environnementales spécifiques inhérentes aux caractéristiques de butinage propres des différentes abeilles ; afin d'obtenir l'image de la contamination globale de l'environnement autour du rucher, les abeilles des différentes colonies ont été aspirées avec un seul aspirateur et consécutivement, fournissant ainsi un pool d'abeilles butineuses. L'aspirateur à main utilisé n'est pas dédié à cet usage mais il permet de répondre à de nombreuses contraintes liées au travail de terrain et à la matrice prélevée : 1/ le bac transparent de l'aspirateur permet un contrôle visuel de la quantité d'abeilles prélevées, 2/ l'autonomie suffisante sans perte de puissance à l'aspiration permet des prélèvements rapides afin de minimiser les perturbations de la colonie, 3/ la congélation de l'ensemble (aspirateur et abeilles) permet de sacrifier les abeilles sans compromettre la qualité de la matrice et de procéder au conditionnement des échantillons, 4/ le matériel peut être facilement nettoyé et désinfecté, 5/ les prélèvements et le reconditionnement peuvent se faire en toute sécurité.



Figure 6. Prélèvements des abeilles butineuses lors de l'étude (A : arrivée et départ des abeilles butineuses sur la planche d'envol ; B et C : prélèvements des abeilles à leur arrivée ou départ sur la planche d'envol ; D : bac transparent contenant les abeilles aspirées) ; (photos CVFSE/Oniris, 2009).

- une matrice **miel**. Le miel est le résultat de transformations biochimiques du nectar récolté sur les fleurs ou du miellat excrété par les pucerons, additionné de « salive » d'abeilles (Clément et coll., 2006). Le miel est stocké dans les cellules et va nourrir la colonie durant la mauvaise saison. Passant d'abeille à abeille par le phénomène de trophallaxie et étant déplacé et stocké dans les alvéoles (au contact des cires), le miel donne une image plus étendue dans le temps de la contamination de l'environnement proche et interne du rucher (traitements apicoles), de quelques jours pour le miel nouveau récolté dans les hausses en été à quelques mois pour celui récolté à la sortie d'hivernage. En fonction de la période considérée, le miel a été prélevé pour chacune des huit colonies, soit à proximité du couvain sur les cadres du corps de ruche, soit sur les cadres de hausse en pleine saison. Deux techniques ont été employées

pour le découpage des rayons, soit à l'aide d'un cutter, soit à l'aide d'un emporte-pièce (Figure 7). Les miels récoltés dans chaque ruche ont été poolés à l'échelle du rucher pour chaque période de prélèvement.

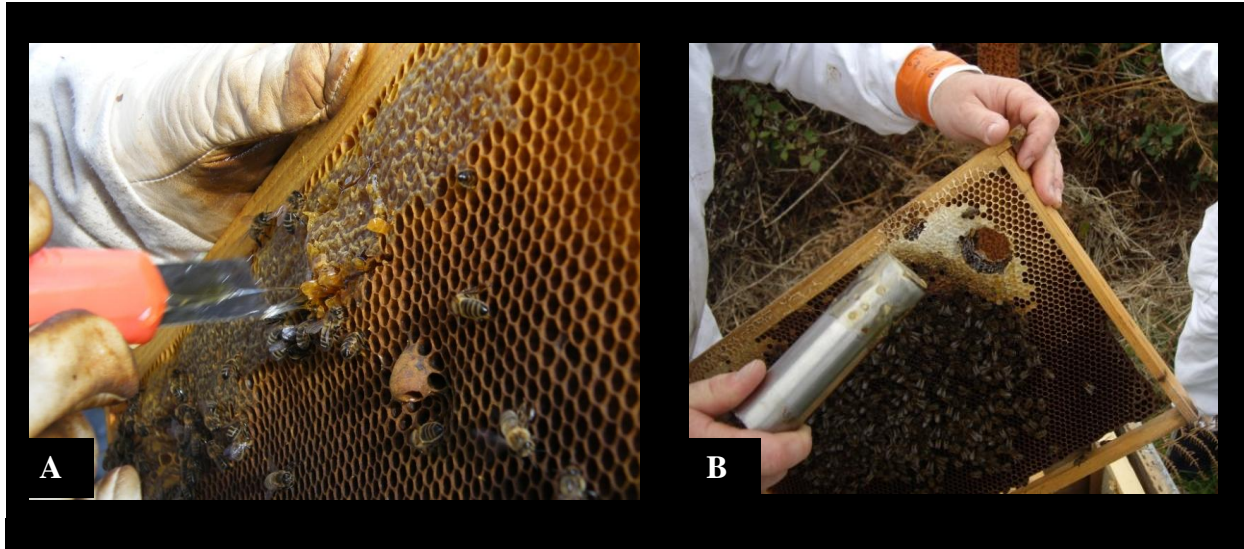


Figure 7. Prélèvements de miel lors de l'étude (A : prélèvement à l'aide d'un cutter ; B : prélèvement à l'aide d'un emporte-pièce) ; (photos CVFSE/Oniris, 2009).

- une matrice **pollen** de trappe. Le pollen est la matière première du développement de la colonie. Directement récolté sur les plantes par les abeilles butineuses, il est un point d'entrée des contaminants de l'environnement aux alentours de la ruche. Base de nourriture des larves et des nourrices, il peut également être le lien direct de la contamination de chaque stade de croissance de l'abeille. Le pollen a été récolté à l'aide de trappes à pollen posées par l'apiculteur bénévole, trois jours avant les prélèvements. Tous les pollens récoltés au sein de chaque colonie ont été poolés par période à l'échelle du rucher (Figure 8).

Tous les échantillons d'abeilles, de miel et de pollen ont été homogénéisés, aliquotés, identifiés puis congelés et stockés à -20°C en attendant les analyses.



Figure 8. Prélèvements de pollens lors de l'étude (A : retrait d'une trappe à pollen ; B : récolte du pollen ; C et D : différents échantillons de pollens récoltés et homogénéisés) ; (photos CVFSE/Oniris, 2009).

1.2.2. Périodes de prélèvements

Quatre séries de prélèvements sur deux saisons apicoles consécutives ont été réalisées sur l'ensemble des dix-huit ruchers :

- fin avril-début mai 2008 (période 1) et 2009 (période 5) correspondant aux premiers pics d'activité des abeilles et aux premières fortes floraisons (colza, arbres fruitiers, arbustes des haies, ...) (Clément et coll., 2006) ;

- fin juin-début juillet 2008 (période 2) et 2009 (période 6) correspondant à la floraison des prairies naturelles et de certains arbres attractifs pour les abeilles (châtaignier, ...) (Clément et coll., 2006) ;

- fin juillet-début août 2008 (période 3) et 2009 (période 7) correspondant à la floraison des prairies naturelles (en particulier les fabacées et papilionacées) et de la flore cultivée (tournesol, maïs, pois, ...) (Clément et coll., 2006) ;

- fin septembre-début octobre 2008 (période 4) et 2009 (période 8) correspondant à la période de floraison de certaines brassicacées (choux) et du lierre. Il s'agit généralement de la période de traitement anti-*Varroa* et de la fin de la saison apicole (Clément et coll., 2006).

La majorité des prélèvements a été effectuée sous un créneau de 2 semaines pour une même période et pour la totalité des ruchers afin d'éviter 1/ les écarts trop importants de phénologie entre taxons botaniques identiques et 2/ des différences climatiques importantes. Ce regroupement des prélèvements est nécessaire pour la comparaison des différents résultats d'analyses, les conditions environnementales des ruchers devant être les plus proches possibles (phénologie, traitements phytosanitaires et vétérinaires, conditions météorologiques, ...) (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1. Calendrier des prélèvements pour l'année 2008 (période 1 : fin avril-début mai ; période 2 : fin juin-début juillet ; période 3 : fin juillet-début août ; période 4 : fin septembre-début octobre).

Identifiant rucher	période 1	période 2	période 3	période 4
A	28/04/2008	02/07/2008	30/07/2008	01/10/2008
B	02/05/2008	26/06/2008	31/07/2008	25/09/2008
C	16/05/2008	24/06/2008	03/08/2008	27/09/2008
D	09/05/2008	27/06/2008	31/07/2008	03/10/2008
E	18/06/2008	09/07/2008	12/08/2008	29/09/2008
F	02/05/2008	02/07/2008	28/07/2008	29/09/2008
G	02/05/2008	26/06/2008	31/07/2008	25/09/2008
H	16/05/2008	23/06/2008	04/08/2008	27/09/2008
I	09/05/2008	25/06/2008	29/07/2008	03/10/2008
IO	05/05/2008	28/06/2008	24/07/2008	29/09/2008
IY	24/04/2008	28/06/2008	04/08/2008	25/09/2008
J	07/05/2008	25/06/2008	29/07/2008	26/09/2008
K	11/06/2008	09/07/2008	06/08/2008	29/09/2008
L	07/05/2008	25/06/2008	30/07/2008	26/09/2008
M	13/05/2008	23/06/2008	28/07/2008	22/09/2008
N	02/05/2008	25/06/2008	24/07/2008	30/09/2008
O	09/05/2008	19/06/2008	29/07/2008	23/09/2008
P	07/05/2008	24/06/2008	28/07/2008	24/09/2008

Tableau 2. Calendrier des prélèvements pour l'année 2009 (période 5 : fin avril-début mai ; période 6 : fin juin-début juillet ; période 7 : fin juillet-début août ; période 8 : fin septembre-début octobre).

Identifiant rucher	période 5	période 6	période 7	période 8
A	11/05/2009	09/07/2009	27/07/2009	28/09/2009
B	15/04/2009	22/06/2009	23/07/2009	05/10/2009
C	20/04/2009	03/07/2009	31/07/2009	28/09/2009
D	06/05/2009	01/07/2009	30/07/2009	29/09/2009
E	06/05/2009	01/07/2009	28/07/2009	28/09/2009
F	21/04/2009	06/07/2009	28/07/2009	30/09/2009
G	15/04/2009	22/06/2009	23/07/2009	05/10/2009
H	20/04/2009	03/07/2009	31/07/2009	28/09/2009
I	04/05/2009	01/07/2009	30/07/2009	29/09/2009
IO	06/05/2009	17/06/2009	31/07/2009	02/10/2009
IY	29/04/2009	01/07/2009	29/07/2009	17/09/2009
J	17/04/2009	24/06/2009	21/07/2009	06/10/2009
K	12/05/2009	02/07/2009	21/07/2009	01/10/2009
L	17/04/2009	24/06/2009	21/07/2009	06/10/2009
M	05/05/2009	03/07/2009	29/07/2009	30/09/2009
N	06/05/2009	30/06/2009	28/07/2009	29/09/2009
O	23/04/2009	25/06/2009	22/07/2009	02/10/2009
P	24/04/2009	02/07/2009	24/07/2009	01/10/2009

1.2.3. Protocole général

La méthodologie générale employée repose donc sur un plan d'échantillonnage rigoureux d'une cohorte de dix-huit ruchers (Figure 9).

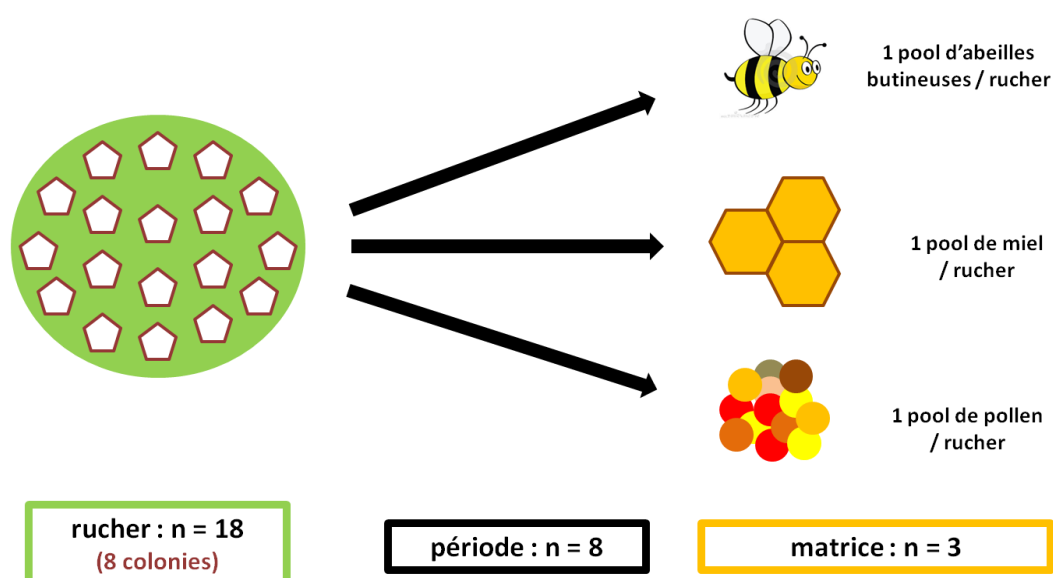


Figure 9. Plan d'échantillonnage des 18 ruchers de l'étude.

1.2.4. Laboratoires partenaires et analyses réalisées

Les échantillons d'abeilles butineuses, de miel et de pollen de trappe ont été envoyés :

- au Laboratoire de Diagnostic Toxicologique^(a) de l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (Oniris) pour le dosage du Plomb (Pb),
- au Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments^(b) (LABERCA) de l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique (Oniris) pour le dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et,
- au Service Central d'Analyse^(c) (SCA) du Centre National de la Recherche Scientifique de Solaize pour le dosage des Substances à Usages Phytosanitaires et Vétérinaires (Figure 10).

Les échantillons de pollen et de miel ont par ailleurs été expédiés pour des analyses palynologiques respectivement à :

- l'Unité d'Expertise 3P « Phytoprotection, Pathologie des abeilles, Palynologie » de Montpellier SupAgro^(d) et,
- au Laboratoire d'Expertise des Miels de Naturalim France Miel^(e) (Figure 10).

Adresse des laboratoires prestataires

^(a) LUNAM Université, Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Laboratoire de Diagnostic Toxicologique, Atlanpole-La Chantrerie, CS40706, Nantes, F-44307, France.

^(b) LUNAM Université, Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Atlanpole-La Chantrerie, CS40706, Nantes, F-44307, France.

^(c) Service Central d'Analyse (SCA), CNRS, Département de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA), UMR 5280 Chemin du Canal, Solaize, F-69360, France.

^(d) Montpellier SupAgro Unité d'Expertise 3P « Phytoprotection, Pathologie des abeilles, Palynologie », Domaine de la Valette, 900 rue JF Breton, Montpellier, F-34090, France.

^(e) Laboratoire d'Expertise des Miels de Naturalim France Miel, ZA Quartier Bel Air, Port Lesney, F-39330, France.

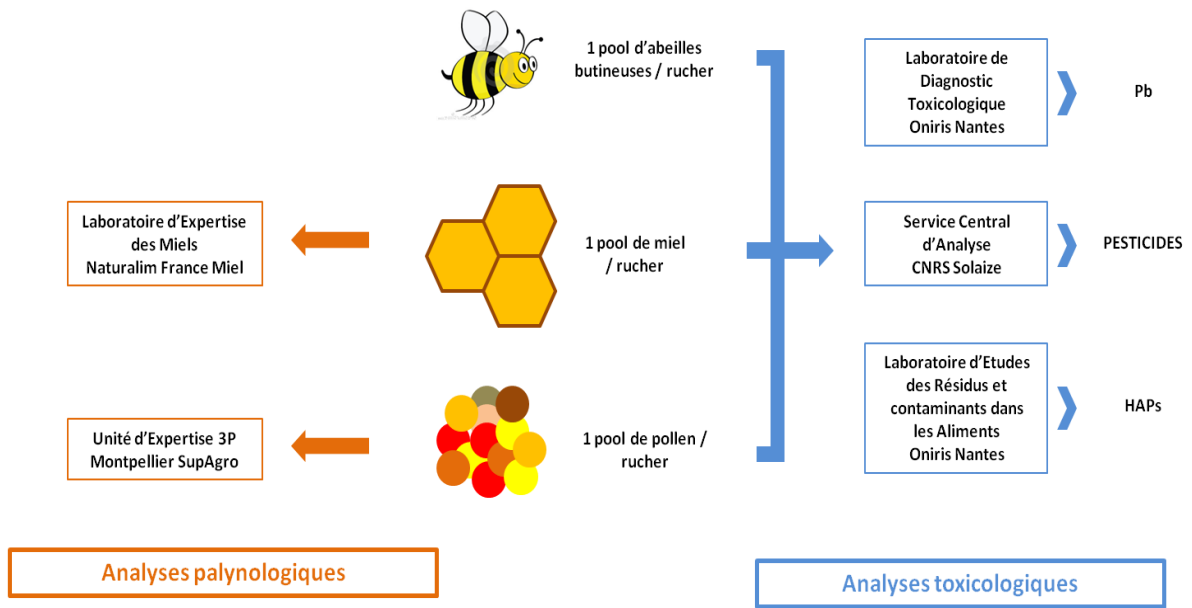


Figure 10. Laboratoires prestataires et analyses correspondantes.

1.3. La caractérisation paysagère de chaque aire de butinage

1.3.1. Types paysagers de l'étude

Quatre grands types paysagers ont été choisis comme caractéristiques des paysages de des Régions Bretagne et des Pays de la Loire et comme susceptibles 1/ de refléter des pratiques d'utilisation ou de rejets de contaminants environnementaux différents et 2/ d'offrir une flore particulière et par conséquent des ressources alimentaires spécifiques pour les abeilles :

- paysages de **type insulaire** caractérisés par une superficie restreinte (limite fixe de l'aire de butinage), une végétation typique (surtout concernant l'île d'Ouessant), un trafic routier et une activité agricole limités, et l'absence d'activité industrielle propre à l'île ;

- paysages de **type urbain** caractérisés par une superficie urbanisée majoritaire, une flore exotique plus importante que dans les autres types paysagers (parcs botaniques, jardins privés et d'agrément, parcs et jardins publics), une circulation automobile et une industrialisation importantes, une activité agricole absente ou limitée ;

- paysages de **type bocage** caractérisés par des grandes étendues de nombreuses parcelles de prairies ou de végétation sauvage, par un maillage de haies dense à lâche créant un morcellement important, et par une activité agricole centrée principalement autour de l'élevage (Burel et Baudry, 1999) ;

- paysages de **type cultures** caractérisés par des grandes superficies de vastes parcelles de grandes cultures (céréales, oléagineux, ...) et/ou de maraîchage, et par un maillage de haies lâche à absent (Burel et Baudry, 1999).

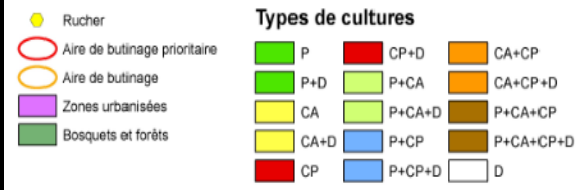
1.3.2. Caractérisation paysagère des ruchers

Les distances parcourues par les abeilles butineuses dépendent directement de leurs besoins en nourriture (nectar, miellat et pollen), en gommes végétales sur les bourgeons des plantes et en eau, donc de la structure paysagère (composition, structure, attractivité mellifère du site, ...) mais également de la saison et de la colonie elle-même (Beekman et Ratnieks,

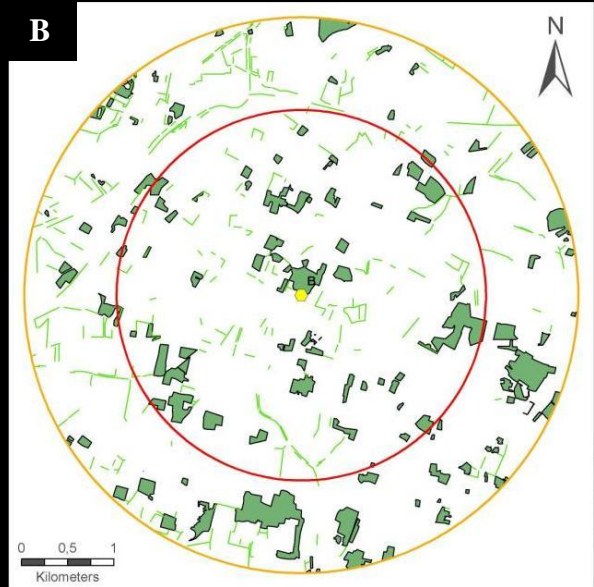
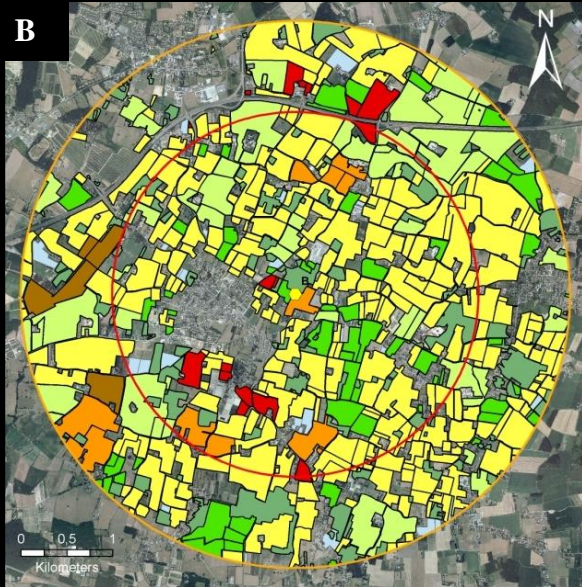
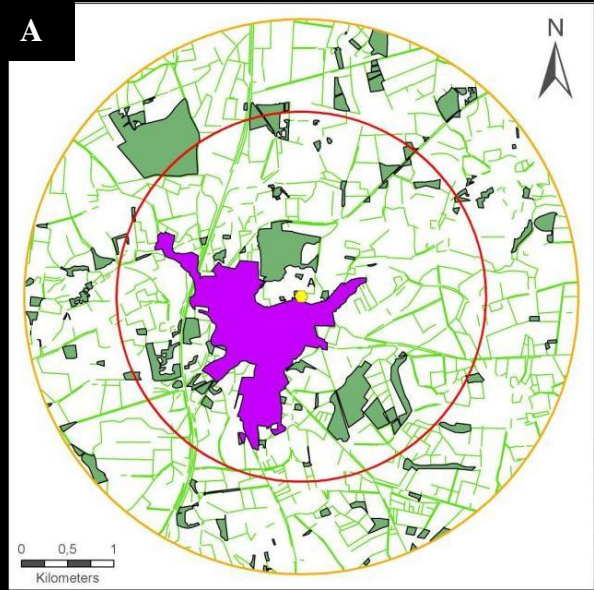
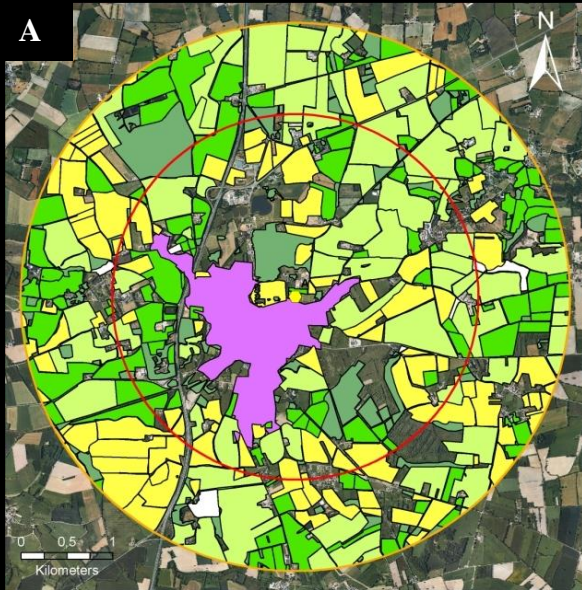
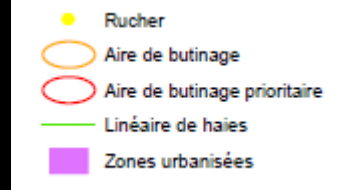
2000 ; Steffan-Dewenter et Kuhn, 2003 ; Janssens *et al.*, 2006). Cette distance varie de quelques centaines de mètres à plus de dix kilomètres (Visscher *et al.*, 1996 ; Beekman et Ratnieks, 2000 ; Bruneau et Colin, 2006), même si les distances moyennes parcourues se situent généralement entre 500 et 2 000 mètres (Visscher et Seeley, 1982 ; Buchmann et Shipman, 1991 ; Baroni *et al.*, 2009), les ressources proches de la ruche étant privilégiées. Dans le cadre de l'étude, l'aire de butinage a été fixée à 3 kilomètres de rayon autour du rucher (soit 2827 hectares) ce qui représente un bon compromis entre les distances moyennes de butinage admises et les distances les plus élevées parcourues.

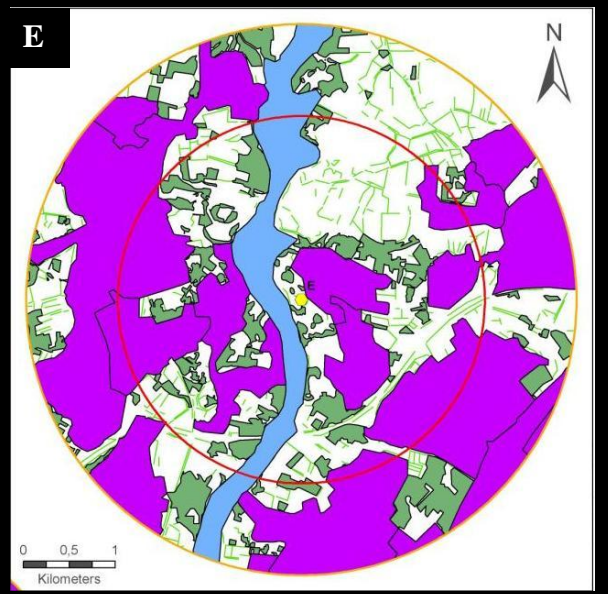
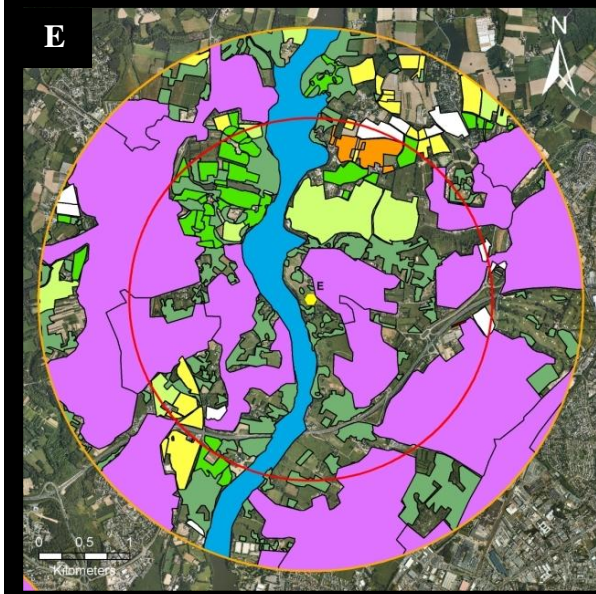
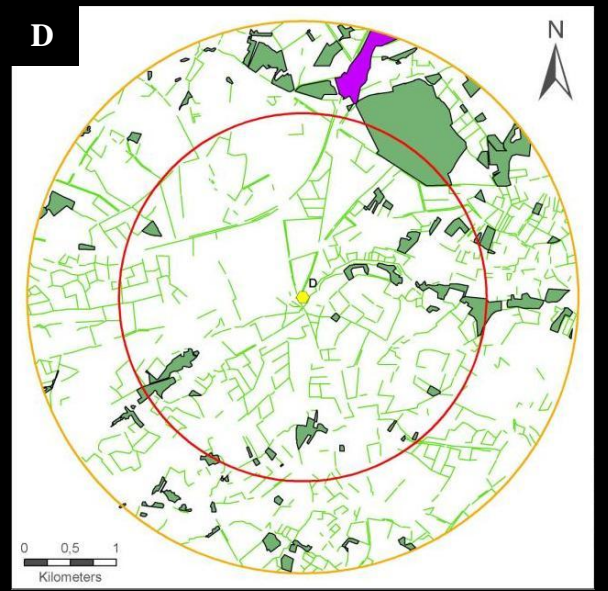
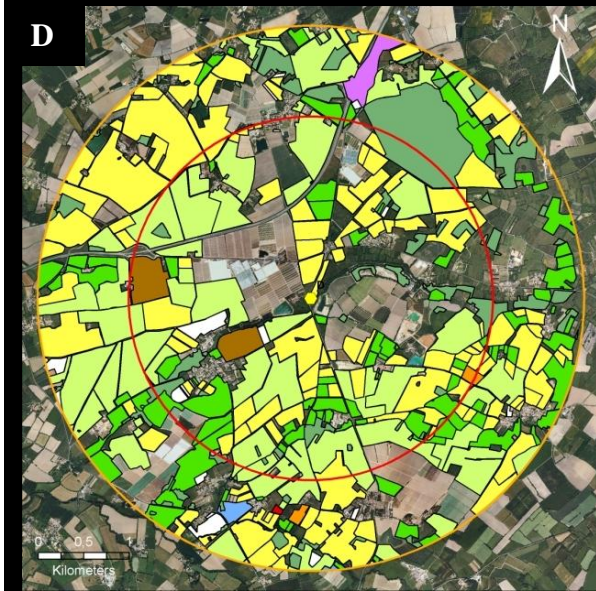
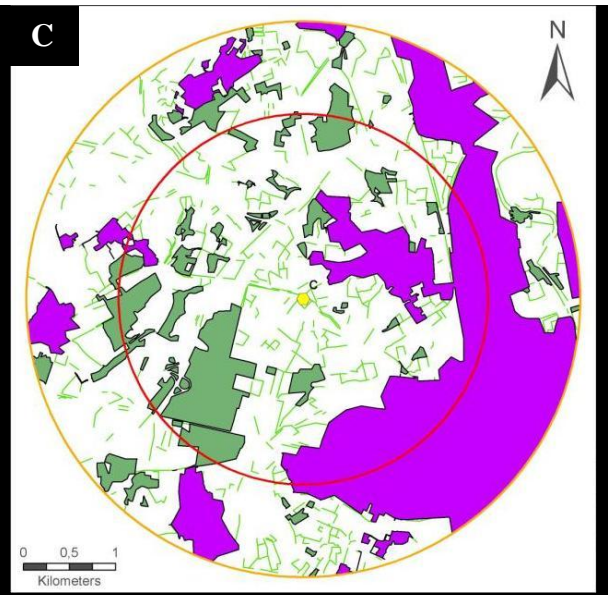
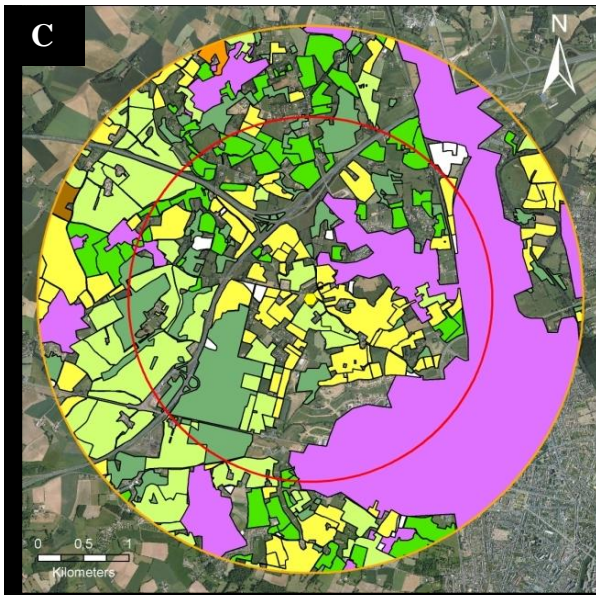
Chaque aire de butinage a fait l'objet d'une analyse paysagère fine à l'aide d'un Système d'Information Géographique (ArcGis 9.2 ; ArcGis 9.3.1) en prenant en compte notamment l'étude des paramètres d'occupation du sol (données Corine Land Cover 2006, données du registre parcellaire graphique de la Politique Agricole Commune 2007 et 2008) et du linéaire de haies (numérisation manuelle sur la base des orthophotos 1/6000^{ème} de 2001 à 2005 selon les départements) (Figures 11 et 11').

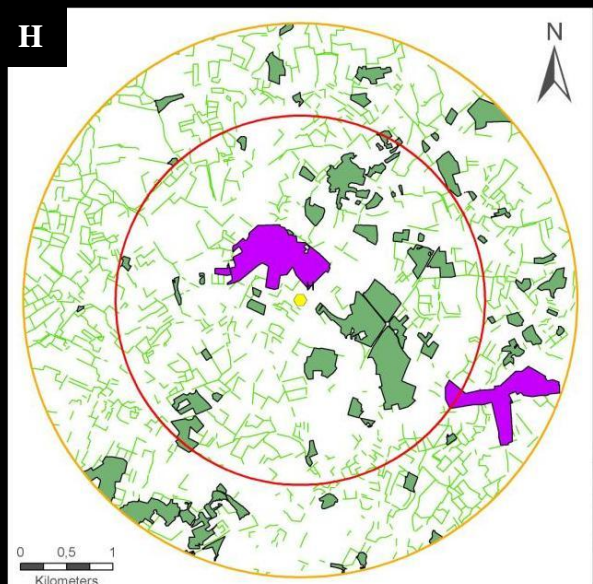
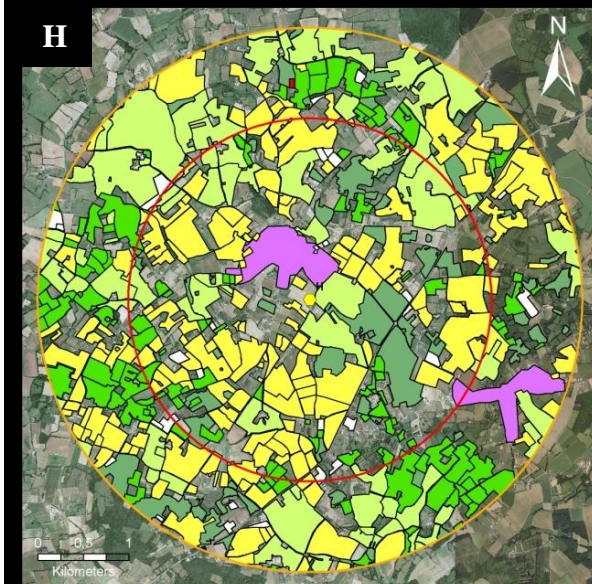
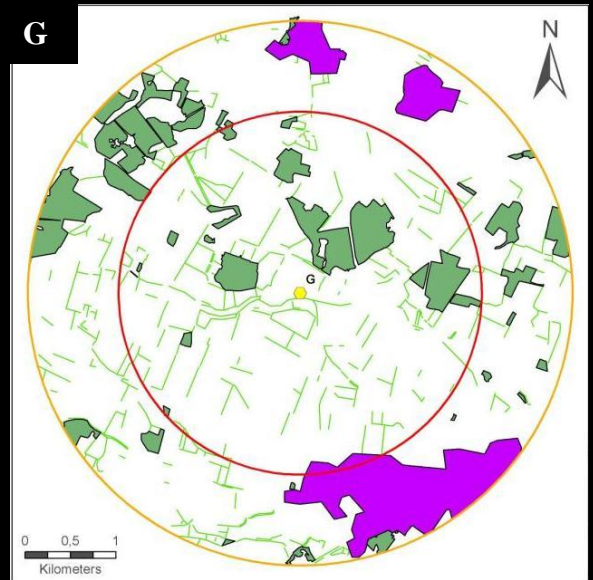
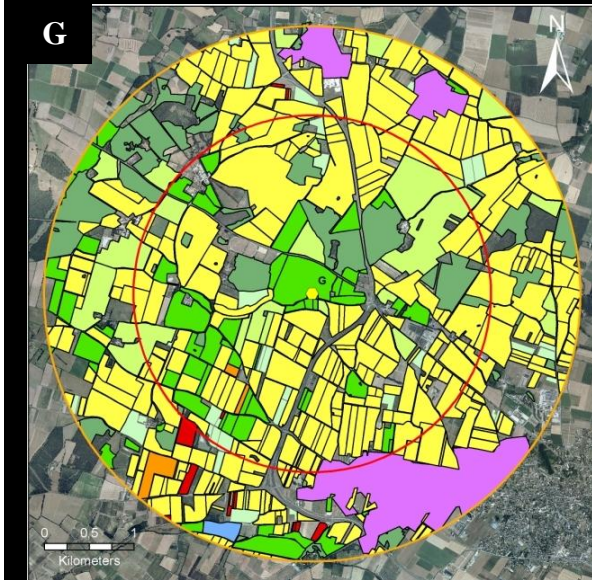
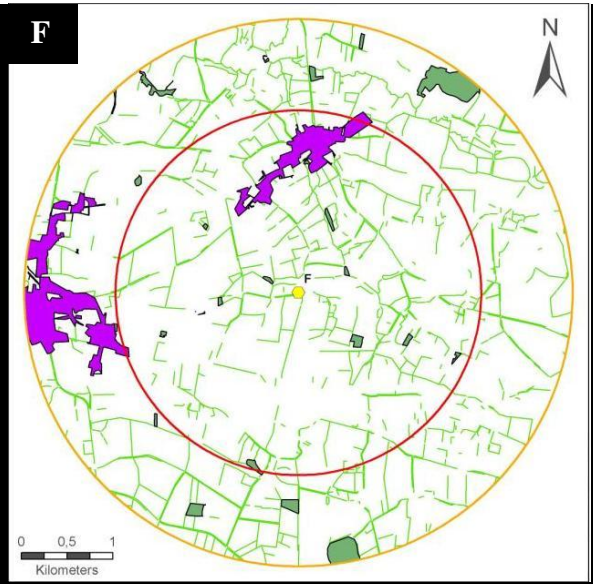
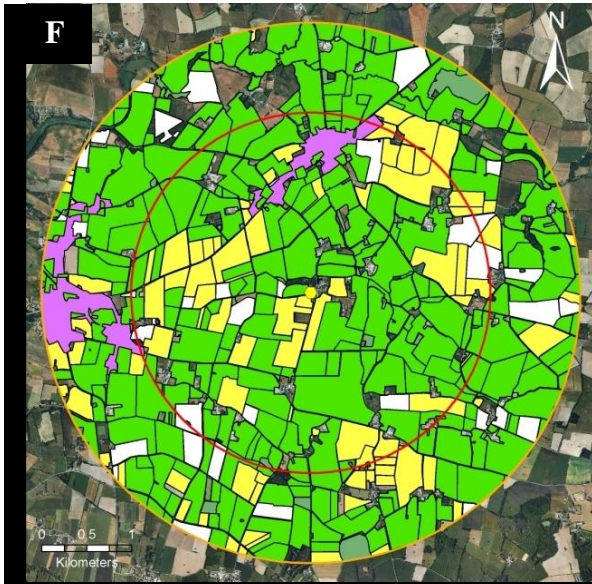
OCCUPATION DU SOL

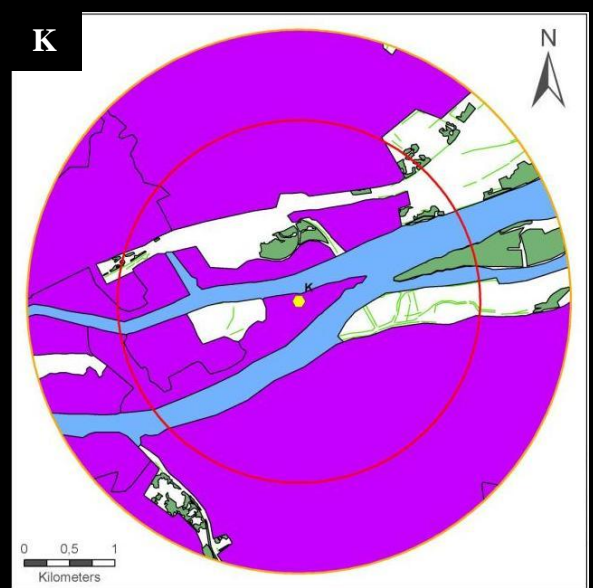
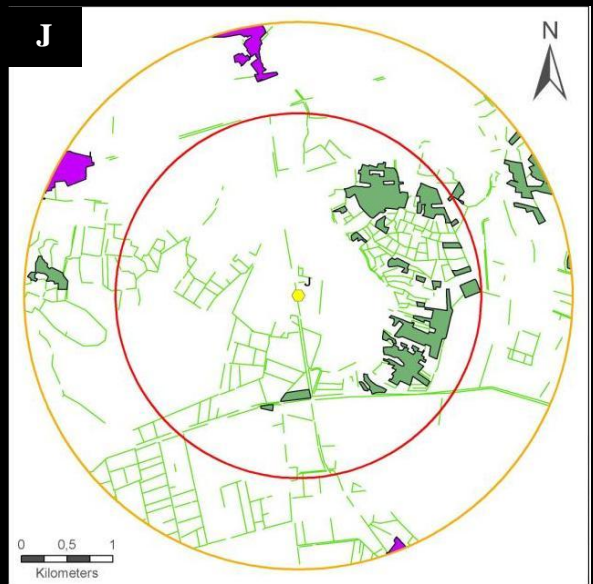
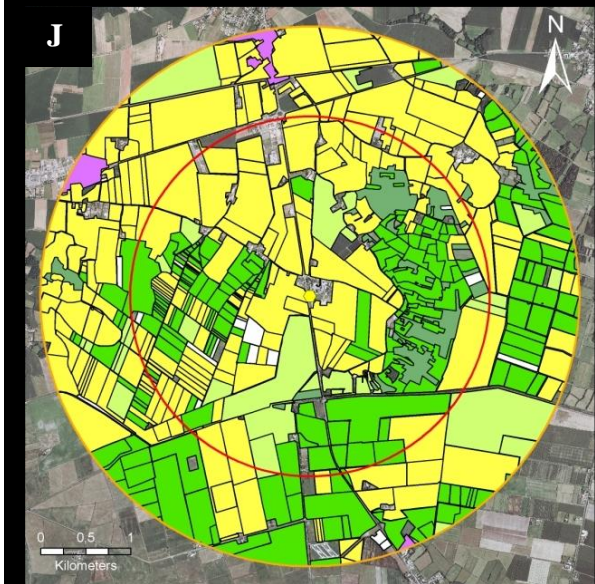
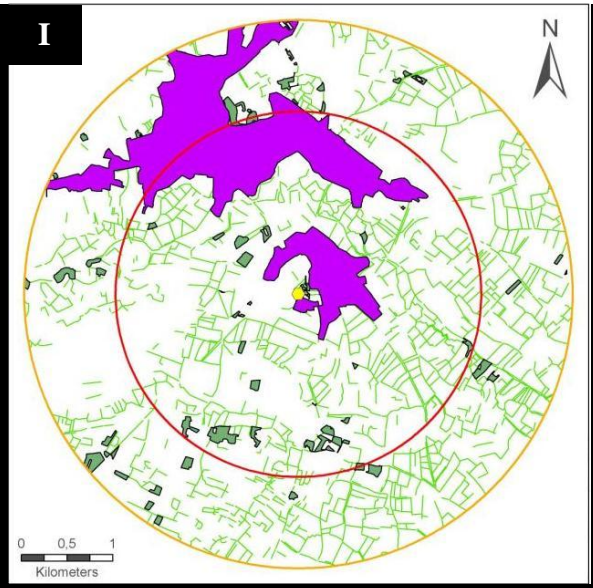
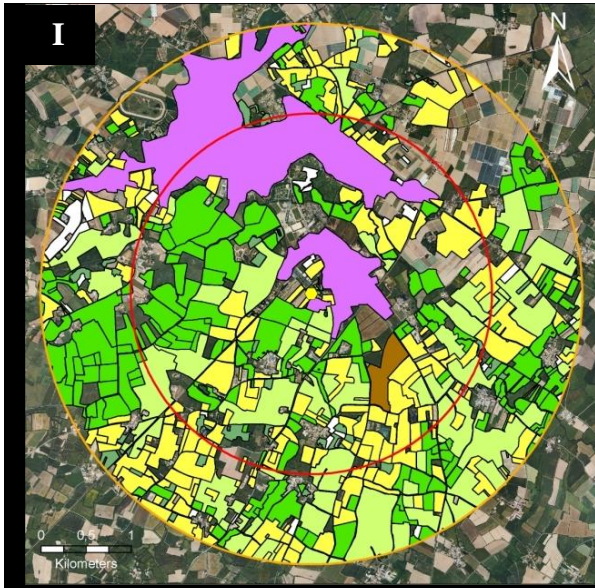


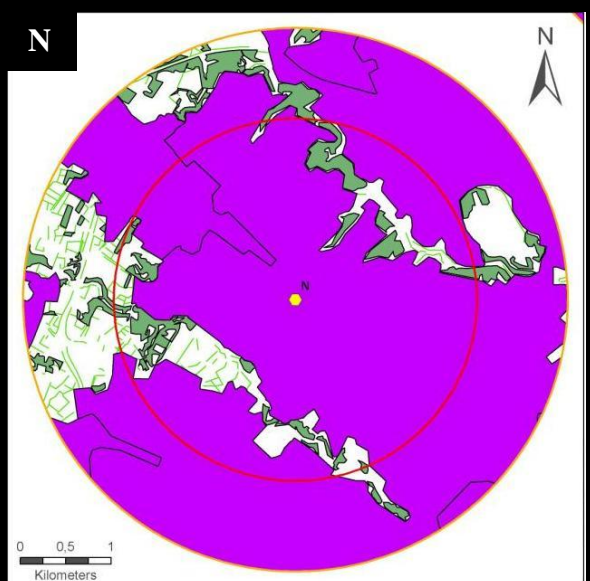
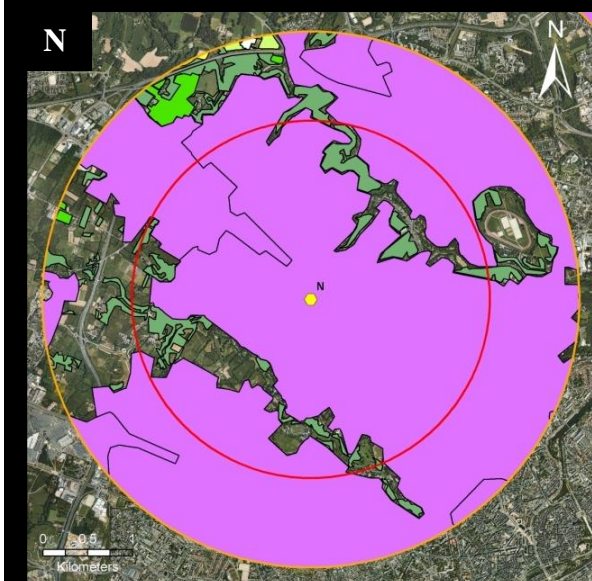
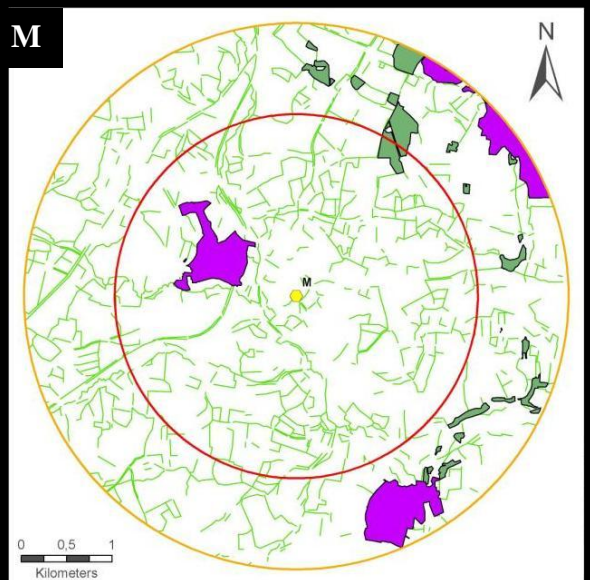
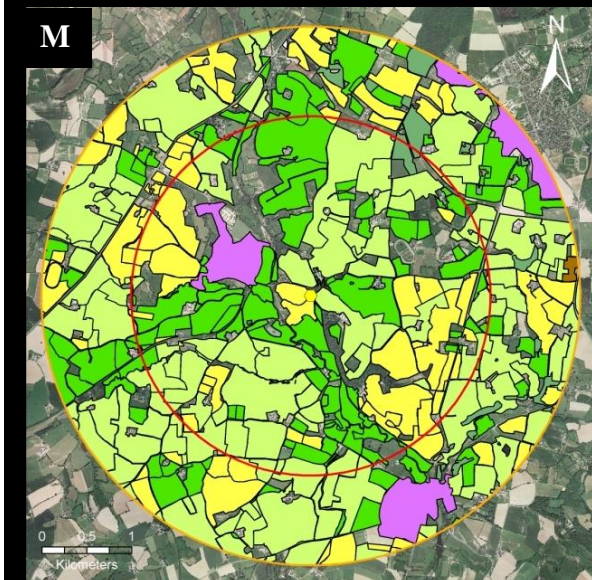
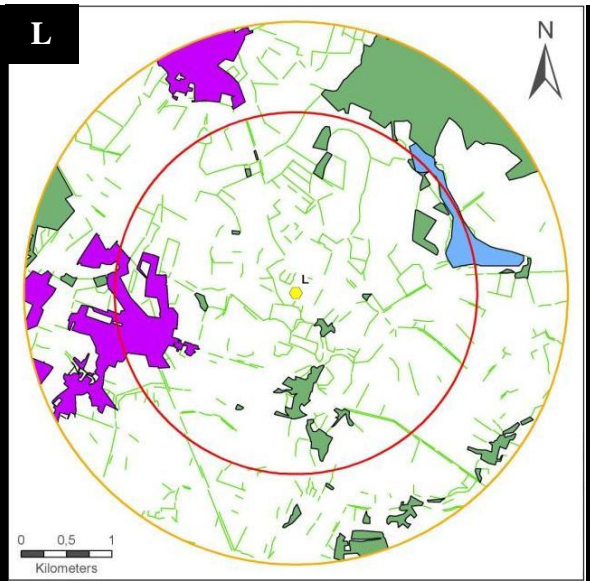
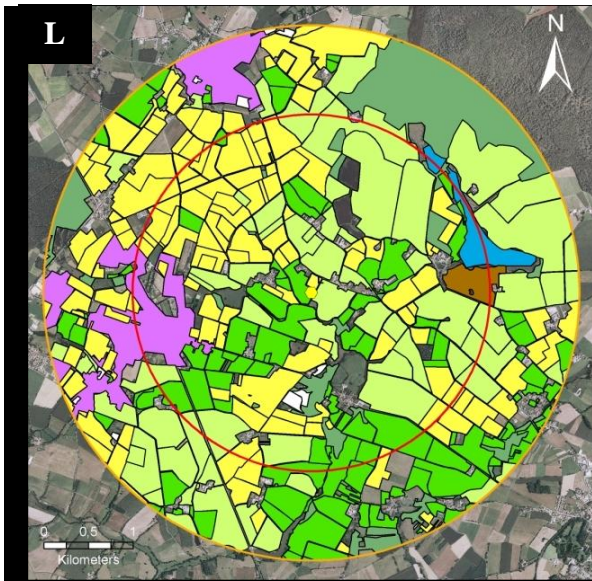
LINEAIRE DE HAIES











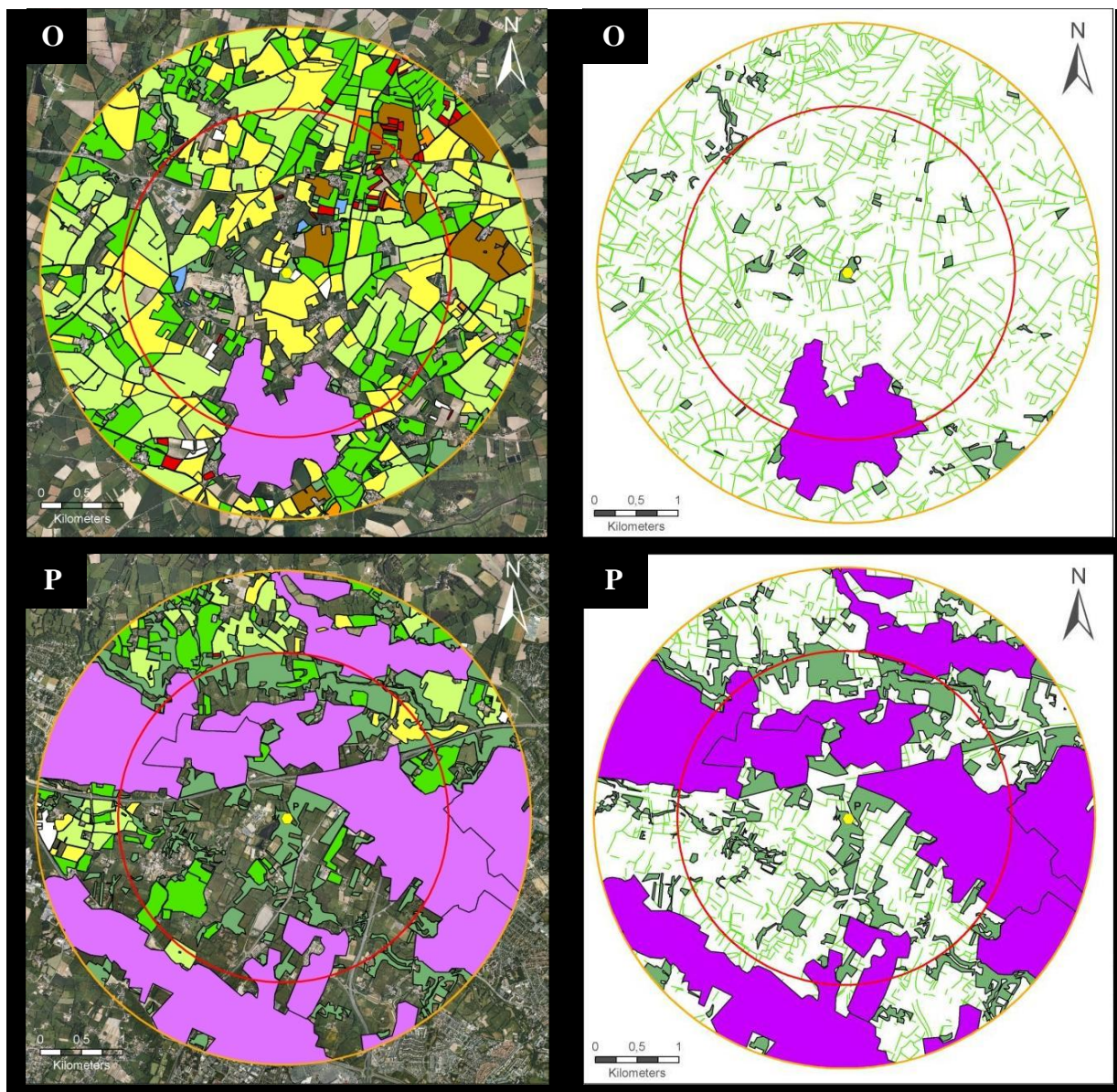


Figure 11. Représentation graphique des caractéristiques paysagères de composition et de structure des aires de butinage de chaque rucher continental (A à P) : à gauche, la carte d'occupation des sols (P : prairies ; CA : cultures annuelles ; CP : cultures permanentes ; D : divers ; zones urbanisées, bosquets et forêts) et à droite, la carte du linéaire de haies. Sources : Corine Land Cover (2006), DRAAF RPG (2007 et 2008), Orthophotos (2001 à 2005) ; conception et réalisation : Romain Caseteuble, CVFSE/Oniris ; ArcGis 9.2.

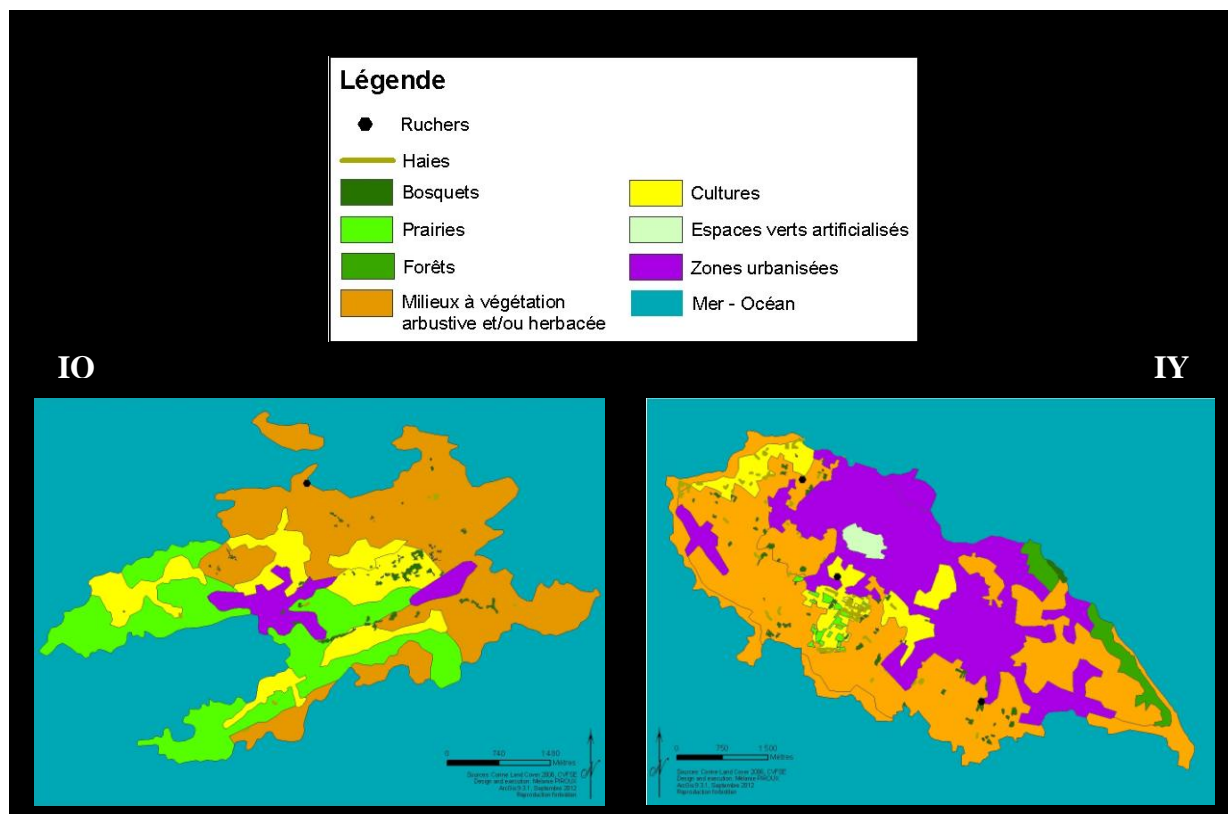


Figure 11'. Représentation graphique des caractéristiques paysagères de composition et de structure des aires de butinage de chaque rucher insulaire (IO, île d'Ouessant et IY, île d'Yeu). Sources : Corine Land Cover (2006), conception et réalisation : Mélanie Piroux, CVFSE/Oniris ; ArcGis 9.3.1.

Pour chaque rucher continental, ont été calculés les paramètres paysagers de composition et de structure, ce qui a constitué le jeu de données paysagères : la surface de forêts et de bosquets, la surface de prairies, la surface de cultures maraîchères, la surface de cultures céréalières, la surface d'oléagineux, la surface de cultures permanentes, la surface de cultures fourragères, la surface d'autres cultures, la surface de jachères, les surfaces urbanisées, les surfaces en eau, les autres surfaces, le linéaire de haies et la taille moyenne des parcelles (voir partie 1.4). L'Analyse en Composantes Principales (Figure 12) et la Classification Hiérarchique en Composantes Principales réalisées sur le jeu de données paysagères permettent de classer les ruchers en fonction de leur appartenance à une structure paysagère précise.

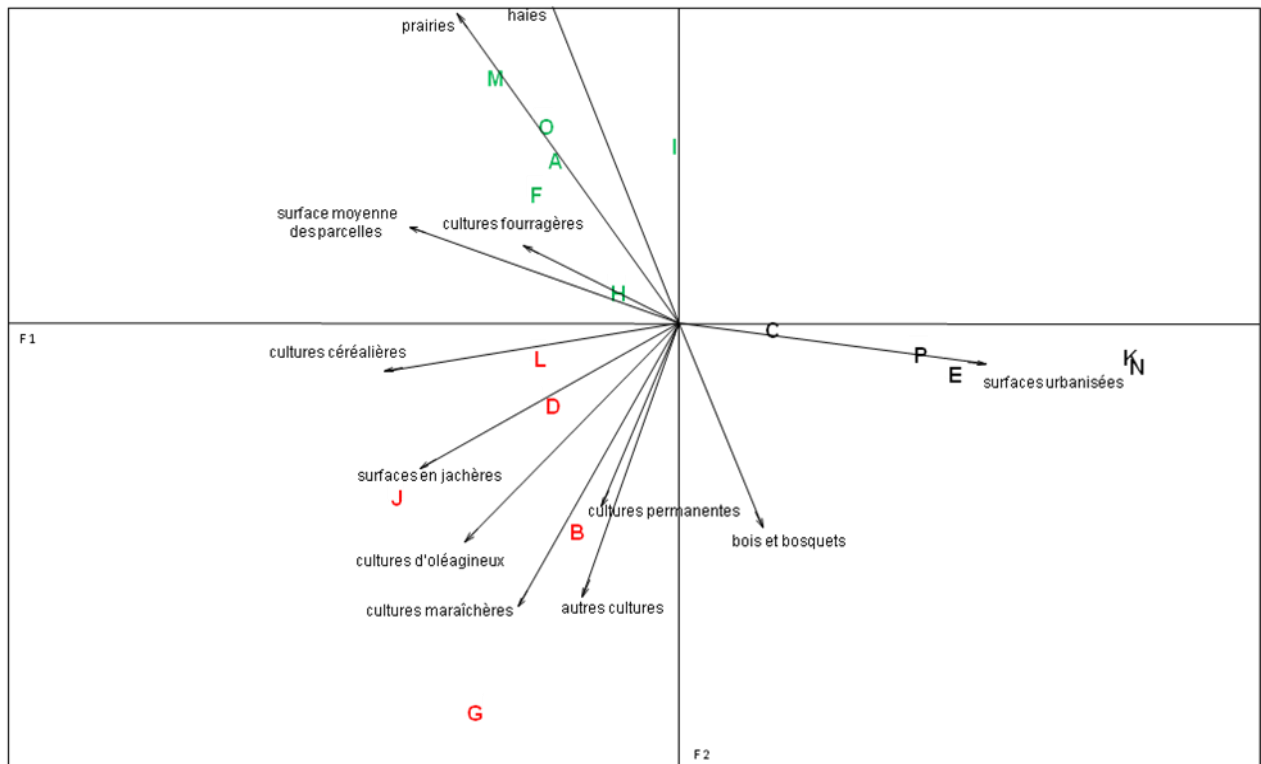


Figure 12. Représentations graphiques de l'Analyse en Composante Principale et de la Classification Hiérarchique des caractéristiques paysagères des 16 ruchers continentaux (ruchers A à P).

Ajoutés aux 2 ruchers en paysage de type insulaire (IO et IY), on obtient ainsi (Figure 13) :

- 5 ruchers en paysage de type urbain (C, E, K, N et P),
- 5 ruchers en paysage de type cultures (B, D, G, J et L), et,
- 6 ruchers en paysage de type bocage (A, F, H, I, M et O).

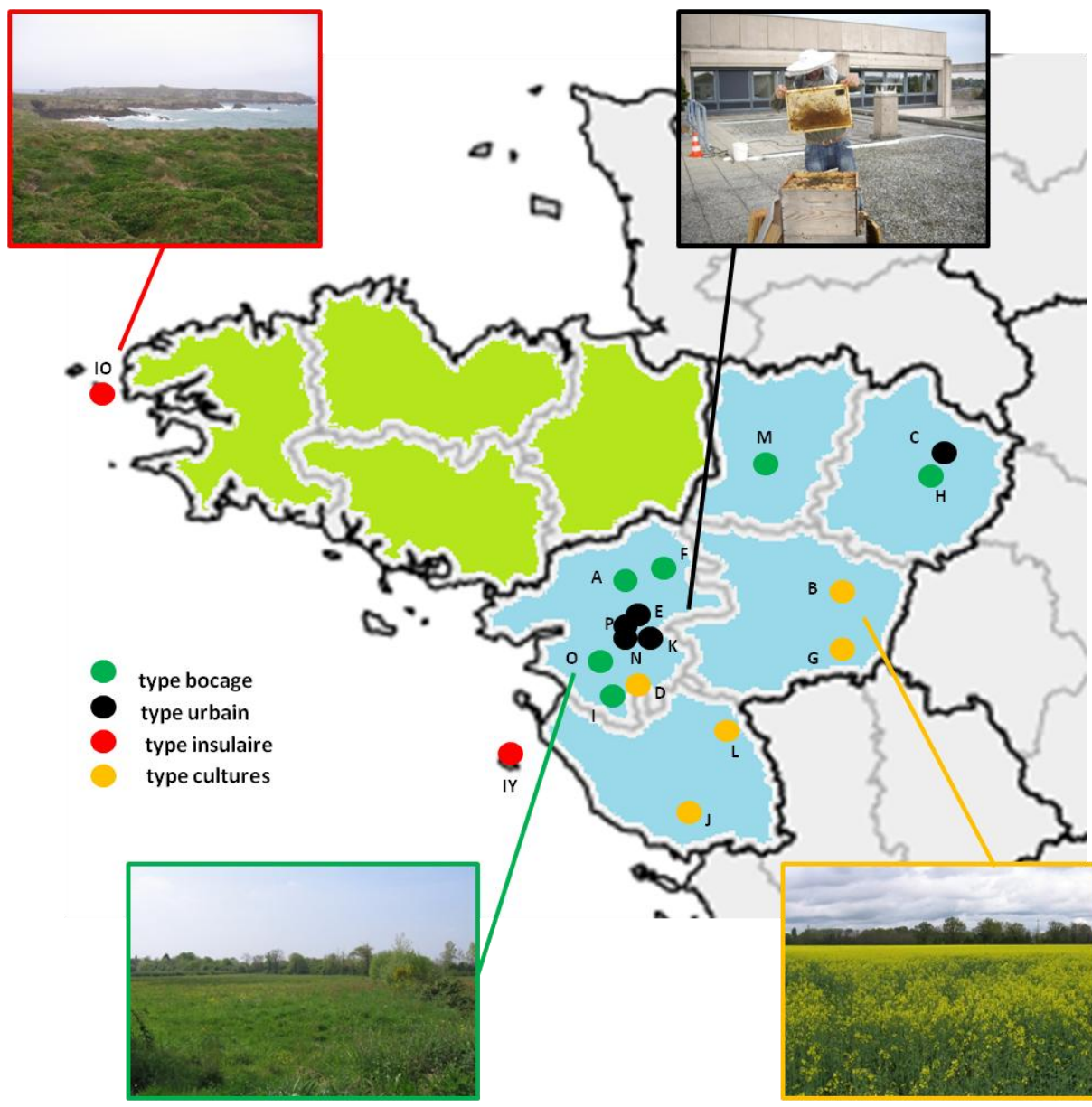


Figure 13. Localisation géographique des 18 ruchers de l'étude par grand type paysager (bocage, urbain, cultures et insulaire) ; (photos CVFSE/Oniris, 2009).

Cette analyse a permis de caractériser le type paysager de l'aire de butinage fixée à 3 kilomètres de rayon autour de chaque rucher. Durant leurs activités de butinage, les abeilles peuvent aller si nécessaire bien au-delà de cette limite arbitraire et les analyses palynologiques du pollen de trappe et du miel récoltés, peuvent apporter des informations complémentaires quant à la composition paysagère précise de l'environnement des ruchers.

1.4. Confrontation des données d'analyse paysagère et des données palynologiques

Cet axe de travail fait l'objet d'un article soumis en juillet 2012 dans la revue *Agriculture, Ecosystems and Environment* (Piroux *et al.*, soumis).

Characterization of foraging area of the honeybees, *Apis mellifera*, in western France by landcover data and pollen spectra

Mélanie Piroux¹ – Olivier Lambert^{1*} – Sophie Puyo¹ – Isabelle Farrera⁴ – Claudine Guinet⁵ – Monique L'Hostis¹ – Bernard Viguès^{2,3} – Suzanne Bastian^{6,7}

¹LUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Plateforme Environnementale Vétérinaire, Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE), Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes, F-44307, France

²Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement », BP10448, Clermont-Ferrand, F-63000, France

³CNRS, UMR 6023, LMGE, 24 Avenue des Landais, BP 80026, Aubière, F-63171, France

⁴Montpellier SupAgro Unité d'Expertise 3P « Phytoprotection, Pathologie des abeilles, Palynologie », Domaine de la Valette, 900 rue JF Breton, Montpellier, F-34090, France

⁵Laboratoire d'Expertise des Miels de Naturalim France Miel, ZA Quartier Bel Air, Port Lesney, F-39330, France

⁶LUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, UMR1300 Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en Santé animale, Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes, F-44307, France

⁷INRA, UMR1300, Nantes, F-44307, France

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)2 40 68 77 76; fax: +33 (0)2 40 68 77 51. E-mail address: olivier.lambert@oniris-nantes.fr

Résumé

Des analyses palynologiques qualitatives ont été réalisées sur des pelotes de pollen et du miel collectés dans dix-huit ruchers de l'Ouest de la France sur une période de deux ans. Les aires de butinage dans un rayon de 3 kilomètres autour des ruchers, ont été décrites en utilisant les

données d'occupation du sol à l'aide d'un système d'information géographique. L'analyse en composantes principales sur les variables d'occupation du sol a permis de différencier trois groupes de ruchers avec une nette opposition entre les paysages urbains d'un côté et deux paysages ruraux d'un autre côté, ces derniers différant par la proportion relative de prairies et de cultures, par la densité de haies et par la superficie moyenne des parcelles. Dans l'analyse des correspondances, les profils polliniques définis à la famille, sont apparus faiblement discriminatoires pour la caractérisation paysagère. Cependant, avec l'analyse de co-inerties et en prenant en compte conjointement les profils polliniques des pollens et les caractéristiques paysagères, il a été possible d'affiner l'appartenance des ruchers à l'un ou l'autre des types de paysages. L'utilité des données palynologiques pour la caractérisation paysagère est discutée en prenant en considération la représentativité du pollen récolté sur différentes plantes dans les aires de butinage de chaque colonie.

Abstract

Qualitative palynological analysis was realized on pellets of pollen and on honey collected in eighteen apiaries from Western France during a two years study. Foraging areas surrounding the apiaries in a 3 km radius were described using land-cover data in a Geographic Information System. Principal Component Analysis on land-cover variables discriminated three clusters of apiaries, with a clear opposition between urban landscapes on one hand and two rural types on the other, the latter differing by the relative proportion of grasslands and crops, by hedgerow density and the average area of plot. In Correspondence Analysis, palynological profiles at the taxonomic precision of family appeared weakly discriminative for landscape characterization. However, with co-inertia analysis taking into account simultaneously the palynological profiles of pollen and landscape features, it was possible to further refine the assignment of apiaries to one or the other type of landscape. The usefulness of palynological data for landscape characterization is discussed with regard to representativeness of the gathered pollen of plant diversity in the foraging area of the colonies.

Keywords: landscape structure, biodiversity, foraging resources, pollen, honeybees

1. Introduction

Over the last decades, profound changes in urban and farming landscapes have occurred. The increasing size of population, lead to a growing urbanization and changes into urban and suburban landscapes (sprawling and densification of built-up areas in the surroundings of the core city) (Loibl and Toetzer, 2002). Likewise profound changes in agricultural practices have altered landscape structure and composition. These changes have been induced by the ones in agricultural production methods, technological advances and government policies (Burel and Baudry, 1990; MacDonald and Johnson, 2000; Robinson and Sutherland, 2002; Le Féon et al., 2010). The major modifications due to intensification of agriculture affected landuse patterns with a large increase of cultivated areas. The other modifications were the fragmentation of uncultivated features such as forests, hedgerows (Burel and Baudry, 1999), natural meadows (Monteiro et al., 2011) and sometimes the loss of these semi-natural elements (Agger and Brandt, 1988; Hobbs et al., 2008). The decrease in landscape heterogeneity has contributed to the decline of biodiversity (McLaughlin and Mineau, 1995; Krebs et al., 1999; Holzschuh et al., 2007; Le Féon et al., 2010) through the loss of suitable habitats and food resources for many species of wild flora and fauna (Robinson and Sutherland, 2002; Benton et al., 2003; Carvell et al., 2007). Hedgerows for example are an attractive habitat and a food resource for many species such as pollinators, especially important in early summer when they tend to have a higher species richness than other agricultural or natural habitats (Hannon and Sisk, 2009).

Landscape structure has strong effect on abundance of flower-visiting honeybees at defined resource patches, plant-pollinator interactions and competition between pollinators (Steffan-Dewenter et al., 2002; Steffan-Dewenter and Kuhn, 2003). Flower diversity is also important for food balance of honeybees and health of the colonies (Crailsheim et al. 1992; Alaux et al., 2010b). Furthermore, it was previously shown that landscape structure is significantly correlated with the concentration of pollutants found in honeybees and beehive matrices (Lambert et al., 2012). The qualification of landscape of foraging areas is therefore important in order to predict food resources and toxic exposition of honeybee colonies. In this study, we have compared palynological data with landscape features for landscape characterization of foraging areas around eighteen apiaries from Western France. This study was developed in order to assess suitability of palynological profiles of pollen for general landscape determination of foraging areas and/or for refinement of landscapes pre-defined by more usual geographical approaches. These colonies were selected from an experimental set

of apiaries currently studied in a broader project using honeybees, honey and pollen as sentinels for species-environment relationships and environmental pollution.

2. Materials and methods

2.1. Study area, sampling sites and biological matrices of hive sampling

Eighteen apiaries owned by eighteen different volunteer beekeepers were selected to participate in this study. The apiaries, named by a letter, were located in six departments in Western France, in two regions Pays de la Loire and Bretagne (Fig. 1): nine apiaries in Loire-Atlantique (44, France), three in Vendée (85, France), two in Maine et Loire (49, France), two in Sarthe (72, France), one in Mayenne (53, France) and one in Finistère (29, France).

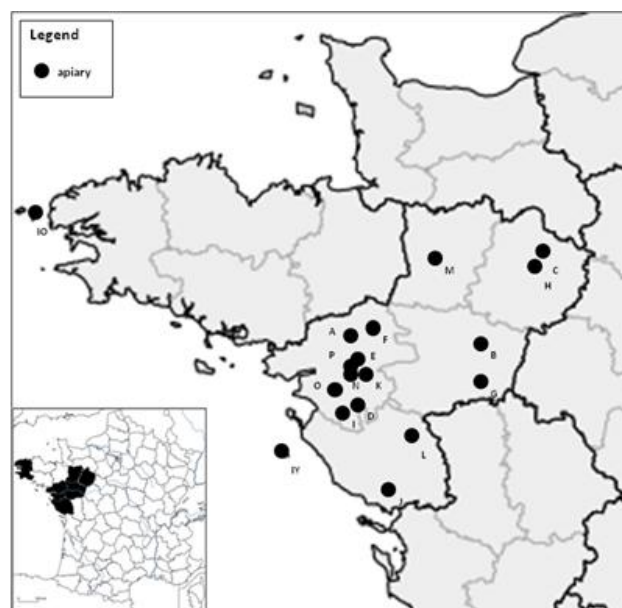


Figure 1. Location of the sixteen continental and two islander apiaries.

Two apiaries IO (Island of Ouessant in Finistère) and IY (Island of Yeu in Vendée) were not included in our analysis because they were islands on the contrary of the continental apiaries of same geographic region.

Foraging distance depends on landscape structure and food resources (Beekman and Ratnieks, 2000; Steffan-Dewenter and Kuhn, 2003) and can reach 13.5 kilometers (to collect nectar) (Visscher et al., 1996). Nevertheless, the average foraging distance varies between 1.5

kilometers (Steffan-Dewenter and Kuhn, 2003) and 6.1 kilometers (Beekman and Ratnieks, 2000), resources near the beehives being privileged. We have chosen a radius of 3 kilometers for the foraging area, equivalent to 2827 ha. This value is a good compromise between the highest values and the average of foraging distance.

Two different biological matrices (a honey pool and a trap pollen pool) were collected from eight colonies in each apiary. Samples were collected at four times points: at the onset of beehive activity after wintering (Period 1: end of April – beginning of May), at the beginning of honey foraging (Period 2: beginning of June – end of July), during middle-end of honey foraging (Period 3: end of July – beginning of August) and during preparation of wintering (Period 4: end of September – beginning of October). The timing collection was reproduced during the consecutive beekeeping seasons (2008-2009).

Honey samples were removed from one brood frame on each colony. Honey was collected as fresh as possible by direct sampling in the honey chambers. Pollen samples were collected in pollen trap set up by the beekeepers three days before the sample was removed. Field collected samples were placed immediately in ice and stored in a standard freezer at -20°C until analysis.

2.2. Landscapes analysis

The land-cover data used for this analysis came from the European data base Corine Land Cover (2006), for urban areas, woodland and water. The identification system for agricultural parcels from the Common Agricultural Policy of Europe (2007) for cultivated areas was used for annual crops, permanent and market garden crops, as well as grassland. The hedgerow networks and the copses were digitalized manually on the basis of satellite pictures (2004), with ArcGis 9.2. The areas, the hedgerow density and the average area of plot were calculated, using ArcGis 9.2.

The fourteen synthetic variables describing land use were chosen by aggregating more detailed categories of land use (Table 1 and Appendix A). The objective was to keep enough details to discriminate different landscape types.

Table 1. Description of the variables (* Declarative data for the year 2007 of the identification system for agricultural parcels Council Regulation (EC) N° 1593/2000 of 17 July 2000).

Variables	Description	Sources	Units
Grassland	natural meadows, temporary	*	ha
Fallow land	fallow land	*	ha
Forage crops	forage, broadbean, pea	*	ha
Grain crops	oat, wheat, maize, barley, rye, ...	*	ha
Oleaginous crops	colza, flax, sunflower	*	ha
Permanent crops	vineyard, orchard	*	ha
Market gardening	fruit, vegetable, aromatic plant, ...	*	ha
Other crops	buckwheat, hemp, tobacco	*	ha
Wood and copse		Corine Land Cover 2006 Digitalized on BD ORTHO ® IGN	ha
Urban area	urban infrastructure, airport, ...	Corine Land Cover 2006	ha
Water		Corine Land Cover 2006 (51.1/51.2)	ha
Others	other utilization declared, no	*	ha
Hedge		Digitalized on BD ORTHO ® IGN	m/ha
Average area of		Field survey among farmers in the	ha

2.3. Palynological analysis

The palynological analyses of pellets of pollen were realized by the Unité de Palynologie from Montpellier SupAgro using the method of Cour in accordance with the European method analysis (Von der Ohe et al., 2004). The palynological analysis of pollen in honey was realized by Naturalim France Miel (laboratory of expertise in honey) with the methodology of Louveaux et al. (1978). Raw data were identification and quantification (family, genus or species depending on the taxon), completed by physiochemical measures and evaluation of the organoleptic qualities, for honey samples.

For this study, the raw data were synthesized into presence or absence of pollens taxonomic level of the family.

2.4. Data analysis

Principal Component Analysis (PCA) on the land-cover variables was used for landscape description (16 sites x 13 variables). It allowed identifying the major dimensions of

landscape variability among the sites. Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC) was used to cluster the apiaries according to landscape traits.

Plant family profiles were compared between the matrices honey and pollen. For this purpose, a Multiple Correspondence Analysis was realized on palynological results (2 matrices x 16 apiaries x 80 families) and information about matrix of origin was added as a supplementary element. Confidence ellipses method (Hatabian and Saporta, 1986) was used to compare if plant's families profiles of pollen and honey were significantly different.

A Heat-map method was used to represent plant family profiles of apiaries regardless to the type of matrix. The rows and the columns of the sites*families table were permuted with a cluster analysis, grouping together apiaries with similar plant family profiles. This basic method was completed by a Correspondence Analysis (CA) on species data (16 sites x presence/absence of 49 families in pollen pellets and 46 families in honey), which allowed characterizing the apiaries by the species of pollen pellets or honey. Pollen found in honey and pellets were processed as separate data for the latter analysis (matrix-specific profiles).

A co-inertia method was developed for simultaneous analysis of plant family profiles (in pellets of pollen or in honey) and land-cover features. This method is used to identify a common structure between CA and PCA, by projecting both analyses onto the same co-inertia space (Dolédec and Chessel, 1994; Dray et al., 2003). The significance of correlation between PCA and CA was evaluated through Monte-Carlo random permutation test.

Statistical analysis was performed with R software (R Development Core Team, 2010), using ade4 and FactoMineR for factor analysis (Thioulouse et al., 1997; Lê et al., 2008).

3. Results

3.1. Landscape data

Table 2 shows the composition and the structure of the sixteen foraging areas.

The choice of variables had been directed by an exact description of landscape. “Water” (river, pond) and “Others” were not considered in the analysis because they were not discriminatory in this landscape analysis (PCA analysis).

Table 2. Characteristics of the sixteen foraging areas: composition (grassland, fallow land, forage crops, gain crops, oleaginous crops, permanent crops, market gardening, other crops, wood and copse, urban, water and others) and structure (hedgerow density and average area of plots).

Apiaries	A	B	C	D	E	F	G	H
Grassland (ha)	1077	363	459	601	162	1292	404	547
Fallow land (ha)	112	151	117	173	30	110	162	185
Forage crops (ha)	26	17	16	5	0	0	76	31
Grain crops (ha)	863	1328	609	889	142	880	931	1050
Oleaginous crops (ha)	97	101	49	80	9	81	208	56
Permanent crops (ha)	0	86	1	6	12	1	26	1
Market gardening (ha)	0	12	0	67	11	10	54	7
Other crops (ha)	1	2	0	0	0	17	59	0
Wood and copse (ha)	253	237	289	231	404	49	268	239
Urban area (ha)	161	207	894	24	1325	127	210	82
Water (ha)	0	0	0	0	197	0	0	0
Others (ha)	237	323	393	751	535	260	429	629
Hedge (m/ha)	82	17	34	55	39	60	24	58
Average area of plot (ha)	5,1	4,4	3,8	4,2	3,1	5,1	3,3	3,4

Apiaries	I	J	K	L	M	N	O	P
Grassland (ha)	916	562	4	816	1190	43	1272	271
Fallow land (ha)	68	286	0	107	96	1	106	6
Forage crops (ha)	38	22	0	32	137	0	25	1
Grain crops (ha)	722	1483	0	1114	1068	16	855	471
Oleaginous crops (ha)	20	68	0	172	36	0	55	0
Permanent crops (ha)	0	9	0	0	0	0	37	0
Market gardening (ha)	4	70	0	16	0	0	9	0
Other crops (ha)	9	18	0	0	0	0	0	16
Wood and copse (ha)	58	101	98	237	54	157	75	417
Urban area (ha)	338	27	2122	184	124	2223	185	1189
Water (ha)	0	0	335	35	0	0	0	0
Others (ha)	654	181	268	114	122	387	208	456
Hedge (m/ha)	69	35	13	33	59	18	87	45
Average area of plot (ha)	2,8	5,1	2,3	5,1	4,9	2,5	3,8	3,4

The urban areas were more important around the apiaries N, K, E and P (more than 1000 ha). The grasslands were dominant in the foraging areas F, O, A and M (more than 1000 ha) (Fig. 2). The area M contained as many meadows as crops. The crops were not much represented in the apiaries K, N, E and P in contrast to sites J, G and B, which had more than 1500 ha of crops.

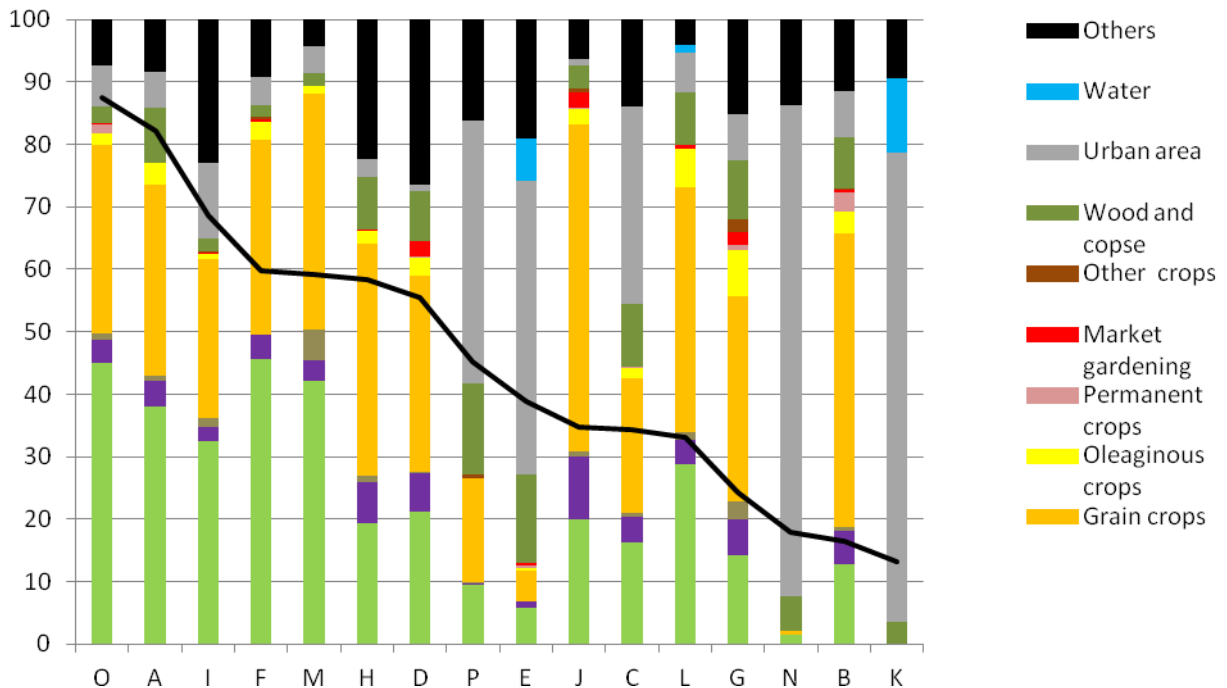


Figure 2. Variables of landscape (% of total surface) and hedgerow networks (m/ha) on the foraging areas of sixteen apiaries (beehives ranked by hedgerows density).

The hedgerows length was between 13 and 87 m/ha and was more important in the apiaries O, A, I, F and M (Fig. 2). The average area of plots varied between 2.3 ha (K) and 5.1 ha (A, F, J, L) with an average of 3.6 ha and a median of 3.8 ha. The apiaries C and O were situated at the level of the median.

3.2. Palynological data

Eighty families (representing wild and cultivated species) were identified regardless of matrix origin. Sixty-three and sixty-two families have been qualified respectively for honey and for pellets of pollen. Thirty-seven families were found exclusively in one matrix (eighteen in pellets and nineteen in honey; e.g. *Alismataceae* in pollen and *Amaryllideae* in honey) whereas forty-three were common to both matrices.

Some families were present only one apiary whereas others, e.g. *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Poaceae* or *Rosaceae* were present in all apiaries and both matrices.

More surprisingly, MCA revealed substantial differences in plant family profiles deduced from pollen pellets and honey. For this reason, profiles deduced from each matrix were seen as complementary for having a global view of pollen resources.

In [figure 3](#), plant family profiles by apiary are represented in a heat-map grouped with a hierarchical clustering method.

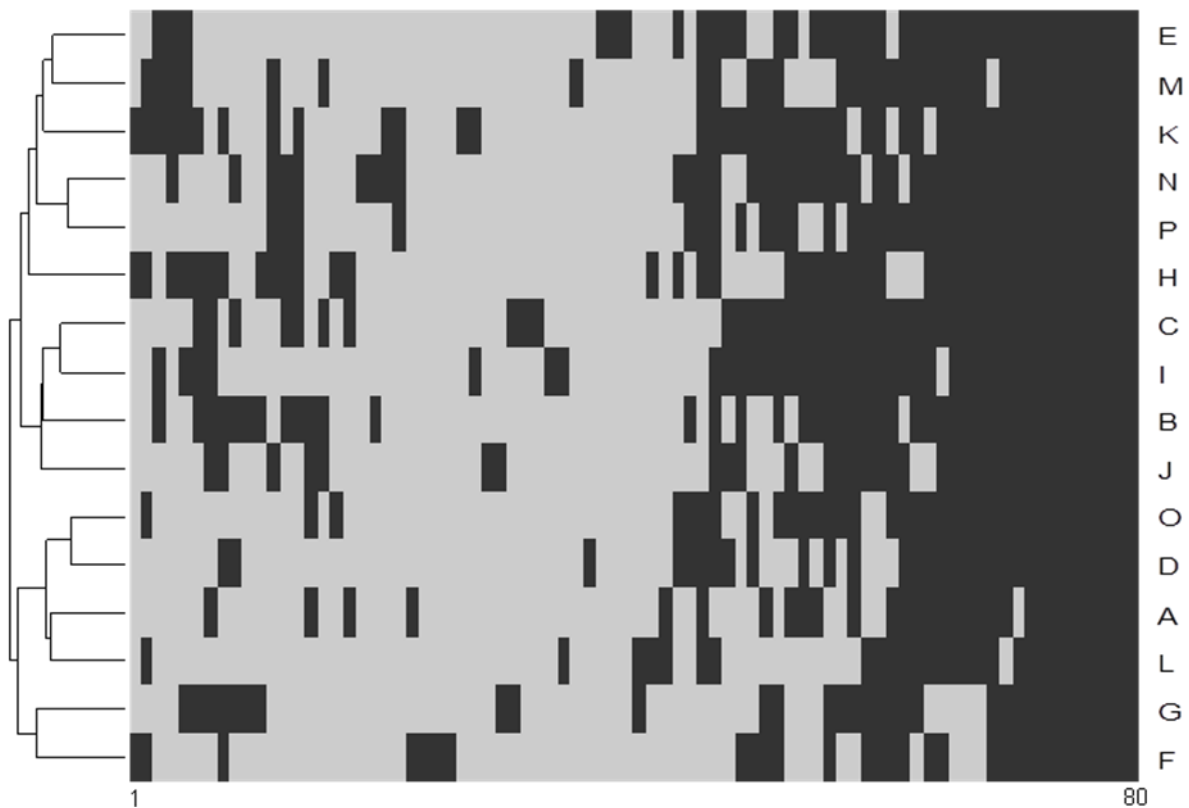


Figure 3. Plant family profiles in pollen of honey and pollen pellets in sixteen apiaries, clustered by Heat-map method. Light grey=absence of the family; dark grey=presence. The 80 families numbered from 1 to 80 are listed in appendix B.

3.3. Classification of apiaries by land-cover data of the foraging area

The first plan of the Principal Component Analysis (PCA) performed on land-cover variables ([Fig. 4](#)) explained 75.09% of total inertia, with the first axis accounting for 50.68% and second axis for 24.41%.

The first principal component F1 opposed, urban areas to rural ones ([Fig. 4](#)). On F2, there was a distinct opposition within rural areas: the variables “grassland”, “hedge” and “forage crops” and “average area of plot” were opposed to “fallow land”, “oleaginous cops”, “market gardening”, “other crops”, “grain crops” and “permanent crops”. We noticed that “hedge” and “grassland” were closely correlated together (r value=0.8) just as “permanent crops” and “market gardening” (r value=0.7).

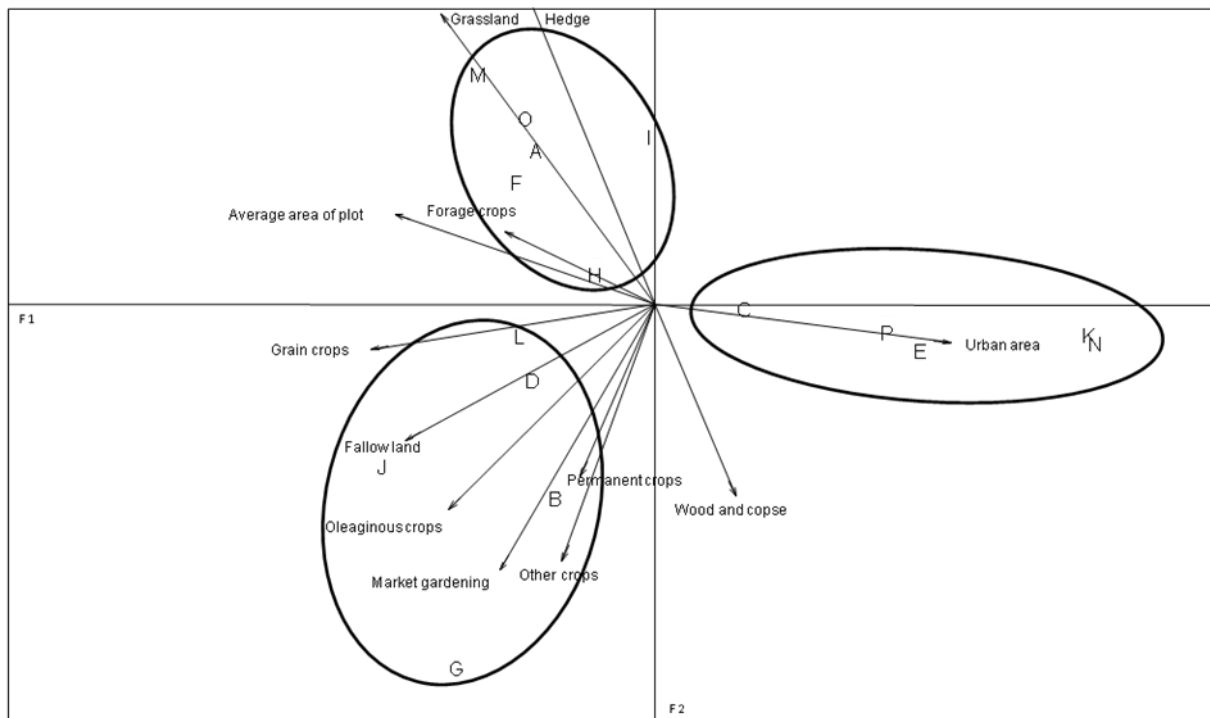


Figure 4. Principal Component Analysis factor map of landscape variables (of foraging areas) and apiaries.

Thus, the land-cover variables discriminated 3 categories of landscape: 1/ urban areas, characterized by vast urban areas and few rural areas (apiaries K, N, E, P, and C), 2/rural-grassland areas, with a higher proportion of grassland areas compared to forage crops, higher length of hedges and a smaller average size of plot (apiaries A, F, M, I, O and H), 3/ rural-cultivated areas with predominance of permanent crops, other crops, market gardening, oleaginous crops, fallow land and grain crops (apiaries B, G, J, D and L).

3.4 Classification of apiaries by palynological data

The Correspondence Analysis realized with families identified in pellets of pollen matrix has not permitted to distinguish groups of apiaries.

The first component of Correspondence Analysis (CA) on families identified in honey matrix (Fig. 5) accounted for 20.5% of total inertia and F2 accounted for 17.7%.

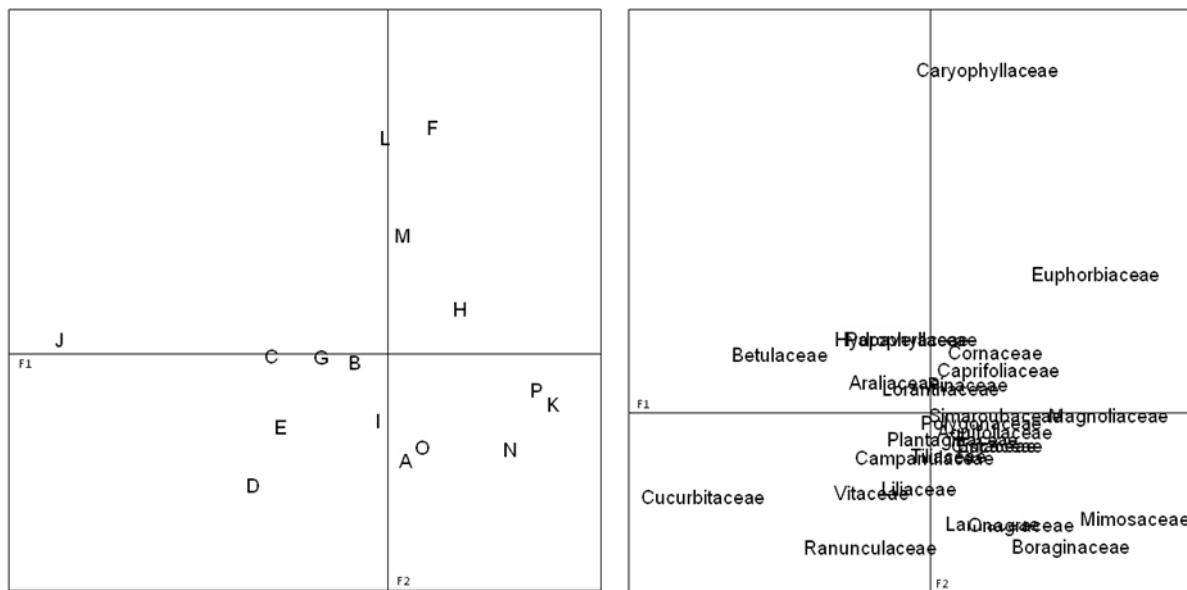


Figure 5. Correspondence Analysis factor map of plant families identified in honey by palynological analysis and apiaries.

The first axis opposed the *Magnoliaceae* and the *Mimosaceae* on one hand and by the *Cucurbitaceae* and the *Betulaceae* on the other hand (Fig. 5, F1).

The second axis the *Caryophyllaceae* and *Euphorbiaceae* were both opposed to the *Boraginaceae* and *Ranunculaceae* (Fig. 5, F2).

3.5 Co-inertia analysis

The co-inertia analysis realized with land-cover data and families identified in pellets of pollen matrix has not permitted to show a connection between land-cover and palynology.

The results of both analyses (PCA and CA realized with the families of pollen in honey) were projected onto the first factorial co-inertia plane (Fig. 6).

Correlation between the axis of the two analyses was tested using Monte Carlo permutation and found significant but low ($r=0.55$, $p<0.01$).

The first axis of co-inertia analysis was represented by the urban area and *Mimosaceae*, *Magnoliaceae*, *Boraginaceae*, *Liliaceae*, *Cistaceae*. These four families were in opposition to *Loranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Hydrophyllaceae* and *Betulaceae* (Fig. 6, F1).

The second axis of co-inertia analysis was represented by 1/the hedge, the grassland and *Caryophyllaceae*, *Hydrophyllaceae* and 2/the permanent crops, the others crops, the

market gardening, the oleaginous crops, the fallow land and *Loranthaceae*, *Campanulaceae* and *Cucurbitaceae* (Fig. 6, F2).

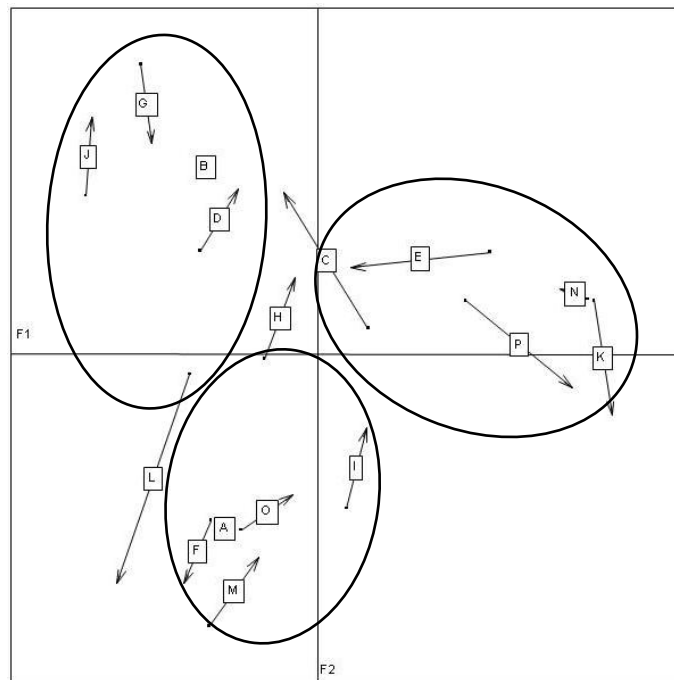


Figure 6. Projections of sites on the first factorial plane of the co-inertia: as computed by principal component analysis landscape data and as computed by correspondence analysis on plant families in honey matrix.

In general, the first plan of the co-inertia was similar to the first plan of the Principal Component Analysis (PCA) and the families of species present in honey completed the analysis. There was more inertia explicated by the first plan of the PCA analysis (99%) than by the first plan of the CA analysis (85%).

The co-inertia analysis discriminated 3 types of landscape. The first group was characterized by urban area with *Mimosaceae*, *Magnoliaceae*, *Boraginaceae*, *Liliaceae* and *Cistaceae*. This category is represented by the apiaries K, N, E, P and C together. The second group was characterized by hedges, grasslands with *Caryophyllaceae*, *Hydrophyllaceae*, the apiaries A, F, M, I, O, H were members of this group. The last group was characterized by permanent crops, other crops, market gardening, oleaginous crops, grain crops with *Loranthaceae*, *Campanulaceae* and *Cucurbitaceae*. This group is composed of the apiaries B, G, J, D, L.

4. Discussion

4.1. Land-cover and landscapes

The different foraging areas could not be classified into clear-cut landscape categories on the mere variables of land-cover and hedgerows density. The analysis rather revealed gradients of hedgerow density and relative proportion of grassland and crop areas. This was not surprising when considering that apiaries were in the same geographic region (Western France) characterized by a hedgerow landscape with mixed farming, where pasture and permanent crops are present (Burel and Baudry, 1990) with a different degree of intensification for each site.

Principal Component Analysis on land-cover variables revealed three categories of landscape were disclosed with an opposition between rural landscapes and urban landscapes characterized by an important urban area. The apiaries K, N, E, P and C clustered in the group characterized by urban areas. The other foraging areas were characterized by rural areas. This analysis also permits to underline a gradient of landscapes.

In a study on comparable landscapes in the same region, Michel et al. (2007), found average proportions for land-cover variables in a typical hedgerow landscape to be 64% grasslands and 36% crops, with a hedgerow density of 803 m/ha and mean parcel size of 0.65 ha. In our study, there was a gradient of hedgerow networks and also a gradient of grasslands and crops. A set of foraging areas (apiaries A, F, I, M and O) was defined by the hedges, the grassland, the forage crops and the average of area of plots, characteristic of hedgerow landscape. A second set of foraging areas (apiaries B, D, G and J) was characterized by the permanent crops, the market gardening, the grain crops, the other crops, the fallow land and the oleaginous crops, which are all indicators of cultivated landscape (Michel et al., 2007). The hedgerow densities in these areas were less important.

The area of plots may be critical for landscape characterization. Increasing the size of fields to fit modern agricultural machinery has been correlated to progressive loss of hedgerows (Burel and Baudry, 1990). The apiary H presented 1/ an important hedgerows density, 2/an area of grassland more important than crops (except forage crops) and 3/ medium sized area. In this way, the apiary H was more related to hedgerow landscapes. The site L was more related to cultivated landscape because the cultivated area was important and the average size of plot was the biggest (5.1 hectares).

4.2. Family profiles of pollen and landscapes

Palynological analysis of pollen pellets and honey provides data on the pollen and nectar resources. Even though pollen identification was only made at the level of families of species, an important taxonomic diversity was shown, with overall eighty families of plants (63 in honey and 62 in pellets).

Within each hive, pollen profiles found in pellets and in honey were different. This observation strongly contrasts with a study from Canada where plants used for the pellets of pollen and the nectar were practically the same (Parent et al. 1990). According to the different species of plants, honeybees will gather either pollen or nectar, or even both of them. For this reason, the two subsets of pollens (pellets and honey) were considered as complementary and were pooled in the Heat-map method to dispose of a complete view of expandable resources within foraging areas. The resulting analysis revealed important redundancy. Many families were indeed common to most apiaries, like *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* or *Rosaceae* known for their high attractiveness for pollinators (Louveaux, 1958). These families constitute the main pollen identified over the two-year analysis. This concept of main pollen was introduced early in palynology and was linked to the finding that honeybees need nutritive elements which are not encountered in all varieties of pollen and have thereby to select plants for quality of their resources (Louveaux, 1958; Hügel, 1962). This probably explains that the same families of pollen (main pollen) were reported in hives from various countries like France, the United States and Brazil (Louveaux, 1959; Almeida-Muradian et al., 2005; Tuell et al., 2008; Boff et al., 2011).

Other families were only present in some apiaries. This pollen corresponded to secondary pollen which is different in function of year, seasons, environment and beehives (Louveaux, 1959). Some secondary families identified in this study were characteristic of land-cover category like *Magnoliaceae*, a family of ornamentals plants in France observed in parks and/or gardening of urban areas.

Correspondence Analysis realized with palynological data in pellets of pollen can't show categories of landscape whereas correspondence analysis with palynological data in honey showed an opposition between rural apiaries and urban apiaries. The difference between these two analyses was linked to palynological data; the honey was more integrator, in terms of pollen, than pellets of pollen. Many reasons can be evoked to explain the difficulty of characterizing landscape through pollen data with the methodology used in this study: 1/only part of the plants is harvested exploited by honeybees. Selective foraging linked to

quality of pollen resources (Louveaux, 1958; Hügel, 1962) may have led honeybees to omit species otherwise characteristic of landscape, 2/ the sampling of honey (and pollen) was not continuous over the two-years study and some families may have been underdetected, 3/the analysis was realized at the taxonomic level of the family and not the species, which may result in some imprecision, 4/ the foraging areas were not homogeneous, with a mix of grasslands, crops, market gardening and urban area, 5/ the analysis was realized with qualitative data but not quantitative data (see below).

However, and despite the above-cited possible shortcomings, the opposition (urban-rural) characterized by families of pollen in honey matched the groups of apiaries that were defined by Principal Component Analysis on the basis of land-cover variables.

4.3. Land-cover, family profiles of pollen and landscapes

The co-inertia analysis, combining land-cover and palynological data (from the honey samples), refines the discrimination between three types of landscapes, one urban landscape and two rural ones.

One group was characterized by urban areas and families of pollen like *Mimosaceae*, *Magnoliaceae*, which are families of ornamental plants found in Western France. There was a relation between urban area, the presence of leisure parks and gardens, and the ornamental plants. The apiaries K, N, E, P and C were clustered in the group corresponding to urban landscape.

A second group was characterized by grasslands areas and hedgerows, along with families of plants such as *Caryophyllaceae* and *Hydrophyllaceae*. This group constituted the hedgerow landscape with a cluster of apiaries A, F, M, I, O and H.

The third and last group was characterized by permanent crops, market gardening, oleaginous crops, others crops and fallow land, and families of pollen such as the *Cucurbitaceae*, *Loranthaceae* and *Campanulaceae*. This association was characteristic of cultivated landscape. Foraging areas B, D, G, J and L belonged to this group.

From a purely methodological stand point, we note that co-inertia-based definition of hedgerow and cultivated landscapes also involved pollen families without any relationships with land-cover data. This was illustrated by the *Loranthaceae* represented by *Viscum album*, an epiphytic and parasitic plant more characteristic of wood and copse areas.

Louveaux (1959) found a correlation between land-cover, plants and pollen. This correlation was far from evident in view to analysis developed in this study. One explanation may reside in the fact that quantitative aspects were not considered in the course of pollen analysis while some families of pollen may conceivably occur everywhere but in different quantities proportional to the area occupied by plants. In this case, the extent of the plant area(s) relative to the size of the foraging area is obviously critical for landscape classification and only weighting qualitative data by quantitative analysis seem appropriate for providing reliable information.

Studies by Louveaux also indicate that stores of pollen are colony-specific, with qualitative differences generated by foraging of “secondary plants” *i.e.* plants providing minor pollen which are not essential for growth of colonies (Louveaux 1958, 1959). Since apiary groups were characterized by minor pollen, constitutive variability of the latter may also contribute to difficulties encountered in landscape classification through palynological analysis.

Low discriminative characteristics of pollen data (as judged by CA analysis) however did not impair co-inertia analysis processed simultaneously on pollen and land-cover data. The co-inertia analysis was statistically significant as judged by the correlation rate (0.56) between the PCA (land-cover variables) and CA (pollen data) analysis. As there was more inertia explicated by the first plan of the PCA analysis (land-cover data) than by the first plan of the CA analysis (pollen data), one would suggest that land-cover variables impacted the analysis in a way sufficient to overcome shortcomings of palynological data. This compensatory effect is consistent with robustness of land-cover data analysis (PCA) compared to pollen data analysis (CA) which appeared poorly discriminative in our study. Ultimately, combined analysis enabled to distinguish three categories of landscapes and to refine definition of urban landscape evidenced by land-cover data alone. Disclosed landscapes were however not very different from each other because apiaries were located in the same geographic region (Western France). It would be interesting to develop a similar analysis in regions characterized by more typical landscapes such as forests in eastern France, scrublands or mountains where one would expect better landscape discrimination. This will be important to assess which parameters may be determinant for optimal exploitation of informative potential of palynological data for landscape classification in a more favorable geographic context.

In any case, analysis of palynological data gives a comprehensive view of available resources for the honeybees. A high diversity of resources is shown here for all three

categories of landscapes, with many plant families common to all foraging areas. A more precise analysis of seasonal resources would be of great interest.

5. Conclusion

We have shown that land-cover data is suitable for landscape characterization of honeybee foraging areas and that pollen spectra may be used to refine this analysis. Our study however indicates that qualitative pollen data alone may be not sufficient for precise landscape determination. Experiments are being designed that will consider quantitative aspects of pollen and include inventory of plant species in foraging areas of interest. Due to their complementarity, these approaches should enable to evaluate representativeness of gathered pollen with regard to plant diversity in foraging areas and to test more precisely reliability of palynological analysis for landscape determination.

Acknowledgements

We thank all the beekeepers for their welcome and their help with the protocol. Many thanks to the regional delegation of the Ministry of Agriculture, in particular Virginie Perin, for providing some of land-cover data.

We are grateful to Isabelle Guilberteaud, Bénédicte Pouleur and Jean-Michel Allard from ONIRIS for the field sampling. We thank Romain Caseteuble for his work on these analyses. And we thank all the sponsors.

This study was supported by the European Union through European Agricultural Guidance Guarantee Fund projects, Nantes Métropole, le Conseil Général de Loire Atlantique, la Région des Pays de la Loire and Pullman hotels by Bee my Friend.

References

- Agger, P., Brandt, J., 1988. Dynamics of small biotopes in Danish agricultural landscapes. *Landscapes Ecology*. 1, 227-240.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*. 6, 562-565.

- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M., 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18, 105-111.
- Beekman, M., Ratnieks, F.L.W., 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L.. *Functional Ecology*. 14, 490-496.
- Benton, T.G., Vickery, J.A., Wilson, J.D., 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 182-188.
- Boff, S., Luz, C.F.P., Araujo, A.C., Pott, A., 2011. Pollen analysis reveals plants foraged by Africanized honeybees in the Southern Pantanal, Brazil. *Neotropical Entomology*. 40 (1), 47-54.
- Burel, F., Baudry, J., 1990. Structural dynamic of a hedgerow network landscape in Brittany, France. *Landscape Ecology*. 4, 197-210.
- Burel, F., Baudry, J., 1999. Des paysages passés aux paysages anthropisés actuels, in : Burel, F., Baudry, J., *Ecologie du paysage, Concepts, méthodes et applications*. Edited by Lavoisier (Editions Tec & Doc), Paris, pp XVII-XXX.
- Carvell, C., Meek, W.R., Pywell, R.F., Goulson, D., Nowakowski, M., 2007. Comparing the efficacy of agri-environment schemes to enhance bumble bee abundance and diversity on arable field margins. *Journal of Applied Ecology*. 44, 29-40.
- Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schöffmann, B., 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*. 38, 409-419.
- Dolédec, S., Chessel, D., 1994. Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology*. 31, 277-294.
- Dray, S., Chessel, D., Thioulouse, J., 2003. Procrustean co-inertia analysis for the linking of multivariate datasets. *Ecoscience*. 73, 1-6.
- Hannon, L.E., Sisk, T.D., 2009. Hedgerows in an agri-natural landscape: potential habitat value for native bees. *Biological Conservation*. 142, 2140-2154.
- Hatabian, G., Saporta, G., 1986. Régions de confiance en analyse factorielle. *Data Analysis and Informatics*. IV, 499-508.
- Hobbs, N.T., Galvin, K.A., Stokes, C.J., Lockett, J.M., Ash, A.J., Boone, R.B., Reid, R.S., Thornton, P.K., 2008. Fragmentation of rangelands: implications for humans, animals, and landscapes. *Global Environmental Change*. 18, 776-785.

- Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Kleijn, D. and Tscharntke, T., 2007. Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: effects of farming system, landscape composition and regional context. *Journal of Applied Ecology*. 44, 41-49.
- Hügel, M.F., 1962. Etudes de quelques constituants du pollen in: *Annales de l'abeille*. V (2), 97-133.
- Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B. and Siriwardena, G.M., 1999. The second silent spring. *Nature*. 400, 611-612.
- Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*. 86, 98-104.
- Le Féon, V., Schermann-Legionnet, A., Delettre, Y., Aviron, S., Billeter, R., Bugter, R., Hendrickx, F., Burel, F., 2010. Intensification of agriculture, landscape composition and wild bee communities: a large scale study in four European countries. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 137, 143-150.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*. 25(1), 1-18.
- Loibl, W., Toetzer, T., 2002. Modeling growth and densification processes in suburban Regions - simulation of landscape transition with spatial agents. *Environmental Modelling & Software*. 18, 553-563.
- Louveaux, J., 1958. Plantes utilisées par les abeilles in : *Annales de l'Abeille, Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (Apis mellifica L.)*. IV, 197-215.
- Louveaux, J., 1959. Recherches sur l'origine des variations qualitatives in : *Annales de l'Abeille, Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (Apis mellifica L.)*. I, 13-111.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G., 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World*. 59(4), 139-157.
- MacDonald, D.W., Johnson, P.J., 2000. Farmers and the custody of the countryside: trends in loss and conservation of non-productive habitats 1981-1998. *Biological Conservation*. 94, 221-234.
- McLaughlin, A., Mineau, P., 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 55, 201-212.

- Michel, N., Burel, F., Legendre, P., Butet, A., 2007. Role of habitat and landscape in structuring small mammal assemblages in hedgerow networks of contrasted farming landscapes in Brittany, France. *Landscape Ecology*. 22, 1241-1253.
- Monteiro, A.T., Fava, F., Hiltbrunner, E., Della Marianna, G., Bocchi, S., 2011. Assessment of land cover changes and spatial drivers behind loss of permanent meadows in the lowlands of Italian Alps. *Landscape and Urban Planning*. 100, 287-294.
- Neumann, P., Carreck, N.L., 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. 49(1), 1-6.
- Parent, J., Feller-Demalsy, M.J., Richard, P.J.H., 1990. Les sources de pollen et de nectar dans la région de Rimouski, Québec, Canada. *Apidologie*. 21, 431-445.
- Robinson, R.A., Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *Journal of Applied Ecology*. 39, 157-176.
- Steffan-Dewenter, I., Münzenberg, U., Bürger, C., Thies, C., Tschardtke, T., 2002. Scale-dependent effects of landscape structure on the three pollinators guilds. *Ecology*. 83 : 1421-1432.
- Steffan-Dewenter, I., Kuhn, A., 2003. Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society B*. 270, 569-575.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S., Olivier, J.M., 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*. 7, 75-83.
- Tuell, J.K., Fiedler, A.K., Landis, D., Isaacs, R., 2008. Visitation by wild and managed bees (Hymenoptera: Apoidea) to Eastern U.S. native plants for use in conservation programs. *Environmental Entomology*. 37 (3), 707-718.
- Visscher, P.K., Crailsheim, K., Sherman, G., 1996. How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights? *Journal of Insect Physiology*. 42, 1089-1094.
- Von der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P., 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. 35, S18-S25.
- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.)*

Appendix A. Detailed description of the variables used in the study (* Declarative data for the year 2007 of the identification system for agricultural parcels Council Regulation (EC) N° 1593/2000 of 17 July 2000).

Variables	Description	Sources	Units
Grassland	natural meadows, temporary	* (PN, PT, PX)	ha
Fallow land	fallow land	* (GE, GB, GI, GV)	ha
Forage crops	forage, broadbean, pea	* (DH, FA, FE, GL, LP, PH, PP, SM)	ha
Grain crops	oat, wheat, maize, barley, rye, ...	* (AC, AV, BA, BB, BD, BH, BP, BT,	ha
Oleaginous crops	colza, flax, sunflower	* (AO, CH, LN, LU, TO)	ha
Permanent crops	vineyard, orchard	* (VE, VI)	ha
Market gardening	fruit, vegetable, aromatic plant, ...	* (FP, LC, PE, PF, PM, PO)	ha
Other crops	buckwheat, hemp, tobacco	* (AT, CU, CV, CW, SR, TA)	ha
Wood and copse		Corine Land Cover 2006 (31.1/31.2/31.3) Digitalized on BD ORTHO ® IGN (2004)	ha
Urban area	urban infrastructure, airport, ...	Corine Land Cover 2006	ha
Water		Corine Land Cover 2006 (51.1/51.2)	ha
Others	other utilization declared, no	* (AU, HC, UN)	ha
Hedge		Digitalized on BD ORTHO ® IGN (2004)	m/ha
Average area of		Field survey among farmers in the foraging	ha

Appendix B. Families of plants identified by palynological analysis in honey and pellets of pollen.

1	<i>Palmaceae</i>	21	<i>Plumbaginaceae</i>	41	<i>Solanaceae</i>	61	<i>Pinaceae</i>
2	<i>Caryophyllaceae</i>	22	<i>Mimosaceae</i>	42	<i>Alismataceae</i>	62	<i>Hydrophyllaceae</i>
3	<i>Primulaceae</i>	23	<i>Lauraceae</i>	43	<i>Chenopodiaceae</i>	63	<i>Tiliaceae</i>
4	<i>Myrtaceae</i>	24	<i>Violaceae</i>	44	<i>Rutaceae</i>	64	<i>Polygonaceae</i>
5	<i>Lythraceae</i>	25	<i>Oxalidaceae</i>	45	<i>Tamaricaceae</i>	65	<i>Caprifoliaceae</i>
6	<i>Geraniaceae</i>	26	<i>Theaceae</i>	46	<i>Aquifoliaceae</i>	66	<i>Sapindaceae</i>
7	<i>Resedaceae</i>	27	<i>Hydrangeaceae</i>	47	<i>Cistaceae</i>	67	<i>Oleaceae</i>
8	<i>Euphorbiaceae</i>	28	<i>Loganiaceae</i>	48	<i>Cucurbitaceae</i>	68	<i>Rhamnaceae</i>
9	<i>Campanulaceae</i>	29	<i>Amaryllidaceae</i>	49	<i>Convolvulaceae</i>	69	<i>Nelumbonaceae</i>
10	<i>Clusiaceae</i>	30	<i>Cannabaceae</i>	50	<i>Boraginaceae</i>	70	<i>Gentianaceae</i>
11	<i>Loranthaceae</i>	31	<i>Verbenaceae</i>	51	<i>Ericaceae</i>	71	<i>Araliaceae</i>
12	<i>Magnoliaceae</i>	32	<i>Cyperaceae</i>	52	<i>Simaroubaceae</i>	72	<i>Salicaceae</i>
13	<i>Urticaceae</i>	33	<i>Ulmaceae</i>	53	<i>Liliaceae</i>	73	<i>Rosaceae</i>
14	<i>Balsaminaceae</i>	34	<i>Smilacaceae</i>	54	<i>Lamiaceae</i>	74	<i>Poaceae</i>
15	<i>Anacardiaceae</i>	35	<i>Rubiaceae</i>	55	<i>Onagraceae</i>	75	<i>Plantaginaceae</i>
16	<i>Betulaceae</i>	36	<i>Taxaceae</i>	56	<i>Vitaceae</i>	76	<i>Fagaceae</i>
17	<i>Menyanthaceae</i>	37	<i>Buxaceae</i>	57	<i>Scrophulariaceae</i>	77	<i>Fabaceae</i>
18	<i>Platanaceae</i>	38	<i>Nymphaeaceae</i>	58	<i>Ranunculaceae</i>	78	<i>Brassicaceae</i>
19	<i>Celastraceae</i>	39	<i>Dipsacaceae</i>	59	<i>Papaveraceae</i>	79	<i>Apiaceae</i>
20	<i>Malvaceae</i>	40	<i>Linaceae</i>	60	<i>Cornaceae</i>	80	<i>Asteraceae</i>

1.5. Conclusion concernant le protocole général et les données préliminaires

Huit séries de prélèvements (périodes 1 à 8) sur deux saisons apicoles successives (2008 et 2009) ont été réalisées sur dix-huit ruchers de l'Ouest de la France afin de récolter trois matrices biologiques (abeilles butineuses, miel et pollen de trappe). Sur chacun des échantillons, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), le plomb (Pb) et les substances à usages phytosanitaires et vétérinaires ont été dosés afin d'évaluer la contamination environnementale propre à chaque rucher.

L'analyse paysagère par interprétation des données d'occupation du sol et des résultats d'analyses palynologiques a permis de classer précisément chaque aire de butinage et donc chaque rucher selon quatre grands types paysagers très différents. Cette étude est ainsi menée sur deux ruchers insulaires, six ruchers en paysage de type bocage, cinq ruchers en paysage de type urbain et cinq ruchers en paysage de type cultures (Figure 14). Chaque type paysager est (i) caractérisé par une flore spécifique et offrant des ressources en plantes sauvages, cultivées et ornementales différentes, (ii) susceptible de refléter des pratiques d'utilisation ou de rejets des contaminants environnementaux spécifiques.

L'approche paysagère est de plus en plus considérée dans les études d'évaluation des niveaux de contamination des matrices apicoles, plus particulièrement lorsqu'il s'agit des contaminations par des métaux lourds ou des HAPs (Codreanu *et al.*, 2009a ; Perugini *et al.*, 2009 et 2011). L'un des enjeux de cette étude est d'intégrer cette approche également dans l'évaluation de la contamination des abeilles, du miel et du pollen par les substances chimiques à usages agricoles et vétérinaires, ce qui, à notre connaissance, n'a encore jamais été réalisé.



Figure 14. Illustrations photographiques des différents milieux observés sur les aires de butinage des ruchers de l'étude (type paysager bocage : A, F, O ; type paysager cultures : B, D, G, J, L ; type paysager insulaire : IO ; type paysager urbain : N) ; (photos CVFSE/Oniris, 2009).

**CHAPITRE 2 - CONTAMINATION DE TROIS
MATRICES APICOLES PAR LES HYDROCARBURES
AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)**



2.1. Contexte des travaux

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) constituent une famille de plus d'une centaine de composés organiques complexes constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène possédant au moins deux cycles aromatiques condensés. Les HAPs sont des polluants environnementaux ubiquistes d'origine naturelle ou anthropique, produits soit lors de la combustion incomplète de matière organique (feux de forêts, éruptions volcaniques), soit lors de nombreuses activités anthropiques, notamment industrielles (gaz d'échappement automobile, chauffage domestique, émissions industrielles, incinérateurs) (Hodgeson, 1990 ; Wang *et al.*, 2001 ; Dong et Lee, 2009). Le transport, la répartition et le devenir des HAPs dans l'environnement sont notamment liés à leurs propriétés physico-chimiques. Les HAPs sont généralement très peu solubles dans l'eau (notamment les HAPs dits à masse moléculaire élevée c'est-à-dire les HAPs ayant au moins 4 cycles aromatiques), liposolubles et volatiles et ont par conséquent une forte tendance à se fixer à la surface des particules en suspension dans l'air ou dans l'eau, notamment de celles de nature organique (Wang *et al.*, 2001 ; INERIS, 2005 ; Maliszewska-Kordybach *et al.*, 2009 ; Amiard, 2011). Les HAPs sont émis dans l'atmosphère et coexistent à la fois en phase gazeuse (HAPs légers) et en phase particulaire (HAPs lourds). Durant les pluies, les résidus atmosphériques de HAPs sont lessivés et déposés sur le sol, les surfaces d'eau ou les organismes vivants. Une fois déposés, ils peuvent être remobilisés et transportés par les masses d'air et les vents sur de longues distances : c'est ainsi qu'ils sont retrouvés dans des échantillons en hautes montagnes, au Groenland ou en Arctique (Garban *et al.*, 2002). Les quantités de HAPs présents dans l'environnement sont caractérisées par une variabilité saisonnière et spatiale élevée. Les températures basses vont privilégier les HAPs lourds donc sous forme particulaire alors que les températures élevées vont privilégier les HAPs sous phase gazeuse : en été le pourcentage de HAPs légers est donc plus élevé qu'en hiver. Les concentrations totales en HAPs sont plus élevées en hiver ce qui est notamment lié, aux émissions dues aux chauffages domestiques (Smith *et al.*, 2001 ; Motelay-Massei *et al.*, 2007), au fait que les HAPs vont rester majoritairement en phase particulaire, et à la diminution du processus de dégradation des HAPs (photodégradation par les UV solaires). De nombreuses études ont mis en évidence des différences de concentrations en HAPs en fonction de la localisation des prélèvements, notamment en fonction du degré

d'anthropisation des sites d'échantillonnage (Garban *et al.*, 2002). Les concentrations en HAPs, plus particulièrement en HAPs lourds, sont d'autant plus élevées que les sites sont urbanisés, industrialisés ou proches d'axes routiers (Pathirana *et al.*, 1994 ; Crépineau-Ducoulombier et Rychen, 2003 ; Maliszewska-Kordybach *et al.*, 2009). En parallèle à cette distribution spatiale, et en lien avec leurs propriétés physico-chimiques, les différents compartiments biologiques et physiques présentent des concentrations différentes en HAPs. Parrish *et al.* (2006) ont par exemple montré que les quantités de HAPs mesurées étaient différentes en fonction des espèces aussi bien chez des plantes que chez des vers de terre. Tao *et al.* (2004) ont montré que les concentrations en HAPs étaient variables en fonction des types de végétaux étudiés, des organes de la plante, et entre les végétaux et le sol. De la même façon, Fismes *et al.* (2002) et Crépineau-Ducoulombier et Rychen (2003) ont observé des différences de concentrations en HAPs entre les végétaux et le sol, plus précisément une répartition spécifique des HAPs en fonction de leurs poids moléculaires, les HAPs légers (moins de 4 cycles aromatiques) étant majoritairement retrouvés dans les parties aériennes et la part des HAPs lourds (plus de 4 cycles) étant plus importante dans le sol et les racines.

Parmi la centaine de composés identifiés, seule une liste restreinte est généralement considérée pour les études environnementales et reprend les seize HAPs classés comme polluants prioritaires par l'Agence de Protection de l'Environnement (Environmental Protection Agency : EPA). Cette liste reprend les HAPs les plus étudiés qui posent des problèmes environnementaux majeurs du fait de leur toxicité : HAPs présentant 2 cycles aromatiques (naphtalène), 3 cycles (acénaphthylène, acénaphène, fluorène, anthracène, phénanthrène), 4 cycles (fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène), 5 cycles (benzo[a]pyrène, benzo[b]fluoranthène, dibenzo[a,h]anthracène, benzo[k]fluoranthène) et 6 cycles (benzo[g,h,i]pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène). Même si les effets toxiques de tous les HAPs sont encore imparfaitement connus, de nombreuses études indiquent que certains HAPs peuvent entraîner des effets systémiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques, ...), des effets sur la reproduction mais également des effets génotoxiques et cancérigènes chez l'animal (Doornaert et Pichard, 2003). Du fait de leur toxicité avérée, le Comité Scientifique de l'Alimentation de la Commission Européenne a proposé en 2005 de suivre le benzo[a]pyrène (BaP), comme marqueur de la présence et des effets cancérigènes des HAPs dans les aliments et a introduit des limites réglementaires pour la concentration maximale en BaP dans les denrées alimentaires. En 2008, le Comité des Contaminants dans les Chaines Alimentaires (EFSA, 2008) a jugé que le BaP n'était pas un indicateur suffisant des effets

cancérogènes et génotoxiques des HAPs dans les aliments et que la somme de huit HAPs lourds (benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène, benzo[g,h,i]pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène) ou que la somme du sous groupe de quatre HAPs (4HAPs : benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[a]pyrène) était plus appropriée comme indicateur.

Ces normes dans les denrées alimentaires, expliquent le fait que la majorité des recherches sur la contamination des matrices apicoles par les HAPs concerne les matrices et les compléments alimentaires comme le miel, ou la propolis (Dobrinas *et al.*, 2008 ; Moret *et al.*, 2010 ; Martena *et al.*, 2011), la contamination du pollen par les HAPs n'ayant à notre connaissance jamais été étudiée. Finalement très peu de travaux ont utilisé l'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les HAPs (Devillers *et coll.*, 2005 ; Perugini *et al.*, 2009), l'abeille étant pourtant reconnue comme une sentinelle pertinente de la contamination par les polluants environnementaux.

C'est dans ce contexte, que l'objectif principal de cette partie est d'évaluer la contamination environnementale par les HAPs autour de ruchers différents des régions Bretagne et Pays de la Loire en utilisant des matrices apicoles comme sentinelles. Les objectifs opérationnels sont 1/ de déterminer quelle est la matrice (abeilles butineuses, pollen de trappe ou miel) la plus appropriée pour cette évaluation, 2/ de mesurer les différences de contamination en fonction de la localisation des ruchers et donc du contexte paysager et 3/ d'évaluer les variations saisonnières sur deux saisons apicoles successives (2008 et 2009). Les analyses ont concerné dans un premier temps les échantillons prélevés sur six ruchers et des analyses complémentaires sur deux ruchers situés en paysage urbain ont été réalisées dans un second temps pour étayer les premières conclusions. Au total, les seize HAPs recommandés par l'APE ont été recherchés dans les matrices apicoles. Les résultats du dosage des 4HAPs recommandés par le Comité des Contaminants dans les Chaînes Alimentaires (EFSA, 2008) sont discutés dans une première partie publiée dans un article. La deuxième partie reprend les résultats concernant les autres HAPs dosés pour les comparer à la bibliographie existante.

2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : les abeilles, le miel et le pollen, sentinelles des contaminants chimiques environnementaux

Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans la revue **Chemosphere 86: 98-104** (Lambert *et al.*, 2012b).

Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants

Olivier Lambert^{a,*}, Bruno Veyrand^b, Sophie Durand^b, Philippe Marchand^b, Bruno Le Bizec^b, Mélanie Piroux^a, Sophie Puyo^a, Chantal Thorin^c, Frédéric Delbac^{d,e}, Hervé Pouliquen^a

^aLUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Plateforme Environnementale Vétérinaire, Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE), Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes, F-44307, France

^bLUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes, F-44307, France

^cLUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Unité de Statistiques, Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes, F-44307, France

^d Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement », BP 10448, Clermont-Ferrand, F-63000, France

^eCNRS, UMR 6023, LMGE, Aubière, F-63177, France

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)2 40 68 77 76; fax: +33 (0)2 40 68 77 51. E-mail address: olivier.lambert@oniris-nantes.fr (O. Lambert).

Résumé

Trois matrices apicoles échantillonnées dans six ruchers différents de l'Ouest de la France ont été analysées pour doser les hydrocarbures aromatiques polycycliques (4HAPs : benzo[a]pyrène, benzo[a]anthracène, benzo[b]fluoranthène et chrysène). Les échantillons ont été collectés lors de quatre périodes différentes pour les années 2008 et 2009. Les échantillons

de miel ont montré les niveaux de contamination en 4HAPs les plus faibles (minimum = 0,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; maximum = 5,80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; moyenne = 0,82 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; écart type = 1,17). Les échantillons d'abeilles ont montré les niveaux de contamination en 4HAPs les plus élevés (minimum = 0,32 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; maximum = 73,83 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; moyenne = 7,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; écart type = 17,83) avec une dispersion importante des concentrations due à quatre pics principaux de concentrations élevées. Les échantillons de pollen ont montré seulement un épisode majeur présentant les concentrations les plus élevées retrouvées en 4HAPs (minimum = 0,33 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; maximum = 129,41 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; moyenne = 7,10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; écart type = 22,28). Les concentrations retrouvées en 4HAPs ont été significativement influencées par le contexte paysager pour tous les échantillons apicoles prélevés.

Abstract

Three beehive matrices, sampled in six different apiaries from West France, were analyzed for the presence of four polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4: benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene and chrysene). Samples were collected during four different periods in both 2008 and 2009. Honey samples showed the lowest levels of PAH4 contamination (min = 0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$; max = 5.80 $\mu\text{g kg}^{-1}$; mean = 0.82 $\mu\text{g kg}^{-1}$; Sd = 1.17). Bee samples exhibited higher levels of PAH4 contamination (min= 0.32 $\mu\text{g kg}^{-1}$; max = 73.83 $\mu\text{g kg}^{-1}$; mean = 7.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$; Sd = 17.83) with a great dispersion of the concentrations due to four main events of high concentrations. Pollen samples showed only one major episode with the highest PAH4 concentration found (min = 0.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$; max = 129.41 $\mu\text{g kg}^{-1}$; mean = 7.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; Sd = 22.28). The PAH4 concentrations found were significantly influenced by the landscape context for all beehive samples.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Bees; Honey; pollen; PAHs

1. Introduction

The assessment of environmental health may be investigated with sentinel species (Lagadic et al., 1998; van der Schalie et al., 1999; Basu et al., 2007). Honeybee (*Apis mellifera* L.) was in particular commonly presented as an appropriate sentinel to monitor the environmental pollution (Kevan, 1999; Porrini et al., 2003; Perugini et al., 2009) due to its biological characteristics: (i) a widespread distribution, (ii) bred for its beehive matrices

(pollen, honey and propolis) resulting in a quite easily capture and in sufficient numbers for studies, (iii) behavior as a wild pollinator species, (iv) a restricted home range, and (v) sensitivity to environmental pollutants.

Beehive matrices can be used as bioindicators of the presence and the levels of pesticides (Rissato et al., 2007; Balayiannis and Balayiannis, 2008; Chauzat et al., 2011), heavy metals (Leita et al., 1996; Tuzen et al., 2007) and other environmental pollutants (Ponikvar et al., 2005). However, few studies concerned the contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). PAHs are a large group of organic compounds containing two or more aromatic rings and belonging to the food and environment contaminants. They are produced by natural and anthropogenic processes. PAHs are ubiquitous environmental pollutants produced during the incomplete combustion of organic matter and during human or industrial activities such as vehicle exhaust, gas-fired or oil-fired heating, incinerators, industrial emissions, (Hodgeson, 1990; Wang et al. 2001; Dong and Lee, 2009).

Most of research papers have been published on PAH levels in air, soil, plants or edibles matrices due to their carcinogenic properties and to their concern in food safety (Tao et al., 2004; Dobrinas et al., 2008; Moret et al., 2010). To our knowledge our study is the first to assess and compare the contamination of three apicultural matrices, namely bees, honey and pollen.

PAHs generally occur in complex mixtures which may consist of hundreds of compounds. Among these compounds, fifteen were identified in 2005 (Commission Regulation, 2005/108/EC) as a priority because they show clear evidence of mutagenicity and genotoxicity in somatic cells, in experimental animals and *in vivo*. Moreover, they have also shown clear carcinogenic effects, excepted for benzo[ghi]perylene, for various types of bioassays in experimental animals (EC, 2002). The Scientific Committee on Food think that these compounds may be regarded as potentially genotoxic and carcinogenic to humans. Thus, this committee suggested to use benzo[a]pyrene as a marker of occurrence and effect of the carcinogenic PAHs in food. In 2008, the scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA, 2008) indicated that the sum of four PAHs (PAH4: benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene and chrysene respectively) can be used as alternatives to benzo[a]pyrene alone as markers of the carcinogenicity of the genotoxic and carcinogenic PAHs, and would be equally effective.

In this context, the aim of the present study was to investigate the contamination of various apiaries to PAHs through analyses on foraging bees, honey and trap pollen over 2 years. Furthermore, the results of this study was expected to provide valuable information

regarding (i) the PAH contamination and level differences between apiaries located in France with particular landscape context (island, specific road network, ...), (ii) the evolution in time of the apiary matrices contamination and (iii) the relevant matrices of choice for monitoring environmental PAH contamination.

2. Materials and methods

2.1. Study area, sampling sites and biological matrices of hive sampling

Six apiaries owned by six different volunteer beekeepers were selected to participate in this study. Two apiaries (apiary A and apiary F) are represented in [Fig. 1](#) and were located in a hedgerow landscape of Loire Atlantique (44, France), one apiary (apiary G) was located in a cultivated landscape of Maine et Loire (49, France), one apiary (apiary M) was located in a hedgerow landscape of Mayenne (53, France), two apiaries were located on islands, one (apiary IO) in the Isle of Ouessant of Finistère (29, France) and one (apiary IY) in the Isle of Yeu of Vendée (85, France) ([Fig. 1](#)).

Three different types of biological matrice (foraging bees, honey and trap pollen) were taken from eight colonies in each apiary. At the first time of sampling, eight colonies per apiaries were selected. Then, all the samples collected during the all lenght of the study from one apiary were always taken from the eight same selected colonies. Samples were collected at four different periods during two beekeeping seasons: (i) at the end of April and at the beginning of May 2008 (period 1) and 2009 (period 5), (ii) at the end of June and at the beginning of July 2008 (period 2) and 2009 (period 6), (iii) at the end of July and at the beginning of August 2008 (period 3) and 2009 (period 7), and (iv) at the end of September and at the beginning of October 2008 (period 4) and 2009 (period 8). At each sampling sessions, samples were taken from the eight colonies chosen and then pooled by biological matrice. In total, 432 samplings were collected: 144 bees samples, 144 honey samples and 144 trap pollen samples.

The samples of foraging bees were removed with a hand dryer Dyson[®] on the hive's flight board, excluding the bees with pollen sac. The honey samples were removed directly from several honeycombs on each colony with a cutter. The pollen samples were collected in pollen trap set up by the beekeepers 3 d before the sampling. Field collected samples were

placed immediately on ice after sampling and stored in a standard freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.2. Reagents and chemicals

All solvents used (e.g. dichloromethane, hexane, acetone, ethanol, cyclohexane, ethyl acetate and toluene) were picograde quality and obtained from Promochem (Wesel, Germany). Florisil (100-200 96 mesh) was provided by Promochem (Wesel, Germany) and Celite was provided by COGER (Paris, France). SPE Envi Chrom-P cartridges were provided by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). The isotopic labelled internal standard compounds ^{13}C PAHs and ^{12}C PAHs were purchased from Promochem (Wesel, Germany). Fluorinate PAHs were purchased from Chiron (Norway).

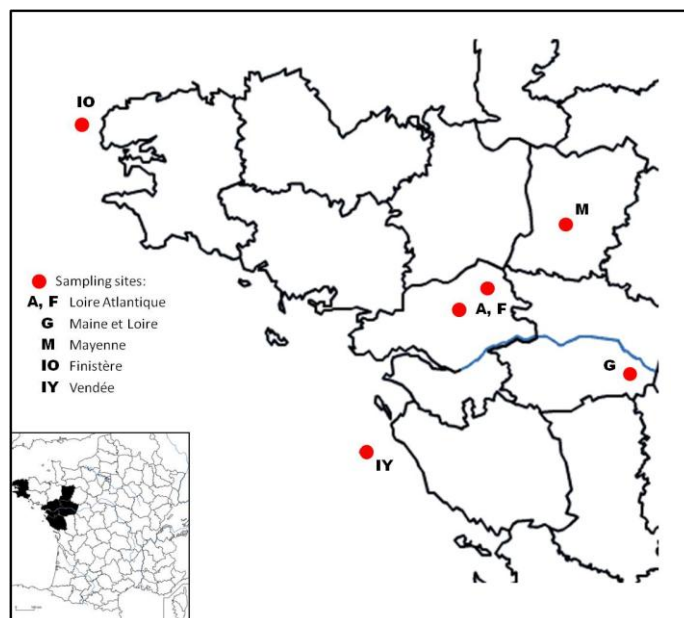


Fig. 1. Location of the six continental and two islander apiaries.

2.3. Instruments and equipments

Samples were extracted by ASE 300[®] (Accelerated Solvent Extractor), from Dionex Corp.

For GC-MS/MS analysis, a gas chromatograph (Agilent, 6890 Series) with split/splitless injector and a programmable oven reaching up to $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ was coupled to a Quattro-micro GC triple quadrupole analyzer (Waters, Micromass) operating in electron

ionization mode. Gas chromatography was performed on a column Zebron ZB-50MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) purchased from Phenomenex (Le Pecq, France).

2.4. Sample preparation

Preparations of the samples were based on a previous method described by [Veyrand et al. \(2007\)](#).

For bees, 10 grams of sample were freeze-dried. The dry residue was weighed in order to determine its water content. One gram of the dry residue was taken and spiked with a mixture of 14 ^{13}C -labelled internal standard (IS). For pollen, 1 g of sample was weighted and spiked with the IS mixture. Extraction of PAHs from both of these matrixes was performed using pressurized liquid extraction. A cellulose filter was placed at the bottom of the ASE cell (66 mL) and filled up with 1.0 g of celite (in order to avoid a possible sealing of the filter) and 15.0 g of Florisil. The florisil was pre-washed in the ASE system with CH_2Cl_2 . One gram of the dry residue sample was introduced into the cell, and extraction was performed with a mixture hexane/acetone (50/50, v/v).

For honey, 1 g was weighted, transferred into a 50 mL tube and spiked with the ^{13}C -labelled internal standard mixture. Ten millilitre of water were added in order to dissolve the honey, and PAH were extracted two times by liquid/liquid extraction with a cyclohexane/ethyl acetate (50/50, v/v) mixture.

The extracts of honey, bees and pollen were purified onto a SPE cartridge (Envi Chrom-P) as follow: after conditioning, the sample was loaded. The cartridge was washed with a mixture of cyclohexane/ethanol (70/30 v/v) and compounds were eluted using 12 mL of cyclohexane/ethyl acetate (40/60, v/v) as mobile phase. Fluorinated PAHs were used as external standards. Two microliters of the final extract (in toluene) were analyzed by GC-MS/MS.

2.5. GC-MS/MS measurement

The sample extracts were injected in the splitless mode. The injector temperature was kept at 300 $^{\circ}\text{C}$. The transfer line temperature was set at 320 $^{\circ}\text{C}$. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . The column temperature program was as follows: 110 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 240 $^{\circ}\text{C}$ (0 min), 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 320 $^{\circ}\text{C}$ (10 min). Electron

ionization (EI) was operated at 70 eV in any case. Temperature of the source was kept at 230 °C. Argon was used as collision gas at a pressure of approximately 3×10^{-4} mbar. PAHs were detected and quantified by monitoring two specific diagnostic signal (MRM transitions).

2.6. Performances

The described method has been validated (Veyrand et al., 2007) and performances have been found fit-for-purpose: limits of detection and limits of quantification were evaluated and were ranged from 0.008 to 0.017 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 0.026 to 0.055 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively. The linearity was assessed on seven calibration levels for each analyte over the respective range of 0.1–50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of dry matter. Coefficient correlation (R^2) was better than 0.99 for all analytes. Recoveries were found in-between 50% and 70%.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using glm and multcomp, lattice and Rcmdr packages in R software (R Development Core Team 2010).

In a first and global approach, the effects of apiary sampling site (*apiary*), beehive matrix (*matrix*), sampling period (*period*) and their interactions on PAH concentrations have been modeled through a general linear model GLM with a gamma distribution and a log - link. Five models have been adjusted, one for each PAH and one for PAH4. Then Tukey's Studentized range tests (HSD Tukey) have been performed to compare PAH concentrations between beehive matrices and different periods.

In a second approach, the same statistical methods have been used to model the effects of apiary sampling site (*apiary*) and sampling period (*period*) on PAH concentrations for each beehive matrix.

To be valid a Generalised Linear Model has to show residuals independantly and normally distributed. Those conditions were checked for each model computed through diagnostics plots included in the R-packages (plots of deviance residuals versus fitted values, normal quantile plot of the Pearson residuals).

3. Results and discussion

For this study, nineteen PAH compounds were monitored, but we focused mainly on four PAHs (PAH4: sum of benzo[a]pyrene (BaP), benzo[a]anthracene (BaA), benzo[b]fluoranthene (BbF) and chrysene (CHR)) as recommended by EFSA (EFSA, 2008).

PAH concentrations measured in bees, honey and pollen are reported in Table 1. The PAH4 concentrations ranged from 0.320 to 73.830 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in bees, from 0.030 to 5.800 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in honey and from 0.330 to 129.410 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen.

The distribution of the PAH4 concentrations in each matrix was highly non symmetric. The lowest concentrations were the most represented while the highest concentrations were the lowest represented.

3.1. Evolution of contamination

The PAH4 concentrations measured in each apiary and for each period are represented in Fig. 2.

Honey samples showed the lowest levels of contamination (mean = 0.82 $\mu\text{g kg}^{-1}$) with a limited variability (sd = 1.17 $\mu\text{g kg}^{-1}$) without peaks equivalents to those observed in bees and pollen. The highest peak in honey matrix reached 5.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the PAH4.

Bee samples showed higher levels of contamination than honey samples (mean = 7.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$) with a great dispersion of the concentrations. We could detect four main episodes of high concentrations of PAH4: 73.83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 71.89 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for apiary IO in periods 3 and 7 respectively (end of July and the beginning of August 2008 and 2009), 46.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 41.23 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for apiary G in periods 1 and 2 respectively (end of April and beginning of May 2008 and, end of June and beginning of July 2008).

In the pollen sample the highest peaks of contamination were observed during the first period (end of April and beginning of May 2008). Apart from this period, pollen presented no other major contamination peak.

As described above a generalized linear model has been performed to model the effect of *apiary*, *period* and *matrix* on the PAH4 concentration. Analysis of deviance table for that global model is presented in Table 2A.

Table 1

Statistical parameters (minimum, maximum, mean, median, sd: standard deviation) established for PAH4 concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in bees, honey and pollen for all the period over 2008 and 2009 by sampling site (apiaries A, F, M in hedgerow landscape; apiary G in cultivated landscape; apiaries IO and IY on islands).

Sampling site	Parameters	Bees	Honey	Pollen
A	Min	0.510	0.090	2.050
	Max	12.780	2.330	40.990
	Mean	4.910	0.869	12.748
	Median	1.770	0.470	3.975
	Sd	5.545	0.890	18.891
F	Min	0.340	0.030	0.440
	Max	1.870	0.940	2.760
	Mean	0.734	0.361	1.040
	Median	0.515	0.160	0.650
	Sd	0.516	0.379	0.827
G	Min	0.400	0.055	0.330
	Max	46.210	0.630	22.950
	Mean	13.417	0.336	4.460
	Median	1.400	0.340	1.600
	Sd	20.760	0.215	8.187
IO	Min	0.870	0.480	0.790
	Max	73.830	5.800	129.410
	Mean	22.091	2.491	23.117
	Median	2.270	2.295	1.250
	Sd	34.691	1.926	52.096
IY	Min	0.330	0.060	0.730
	Max	1.340	0.730	10.090
	Mean	0.615	0.250	2.699
	Median	0.495	0.190	1.420
	Sd	0.352	0.224	3.144
M	Min	0.320	0.120	0.770
	Max	2.220	1.230	2.450
	Mean	0.707	0.559	1.438
	Median	0.425	0.515	1.265
	Sd	0.743	0.368	0.798
All apiaries	Min	0.32	0.03	0.33
	Max	73.83	5.80	129.41
	Mean	7.03	0.82	7.10
	Median	0.87	0.44	1.40
	Sd	17.83	1.17	22.28

The sampling *period* had a significant effect on the levels of exposure of samples (GLM, $p < 0.0001$), but this effect depended on the sampling site, due to a significant interaction between *apiary* and *period* effects (GLM, $p < 0.0001$). Periods 1 (end of April and beginning of May 2008) and 3 (end of July and the beginning of August 2008) appeared more contaminated than the others (HDS Tukey, $p < 0.05$), because of the major contamination of the most polluted apiaries IO and G (HDS Tukey, $p < 0.05$). On the contrary apiary IY was

less contaminated on period 1, with a maximum concentration of PAH4 of $0.91 \mu\text{g kg}^{-1}$, in bees.

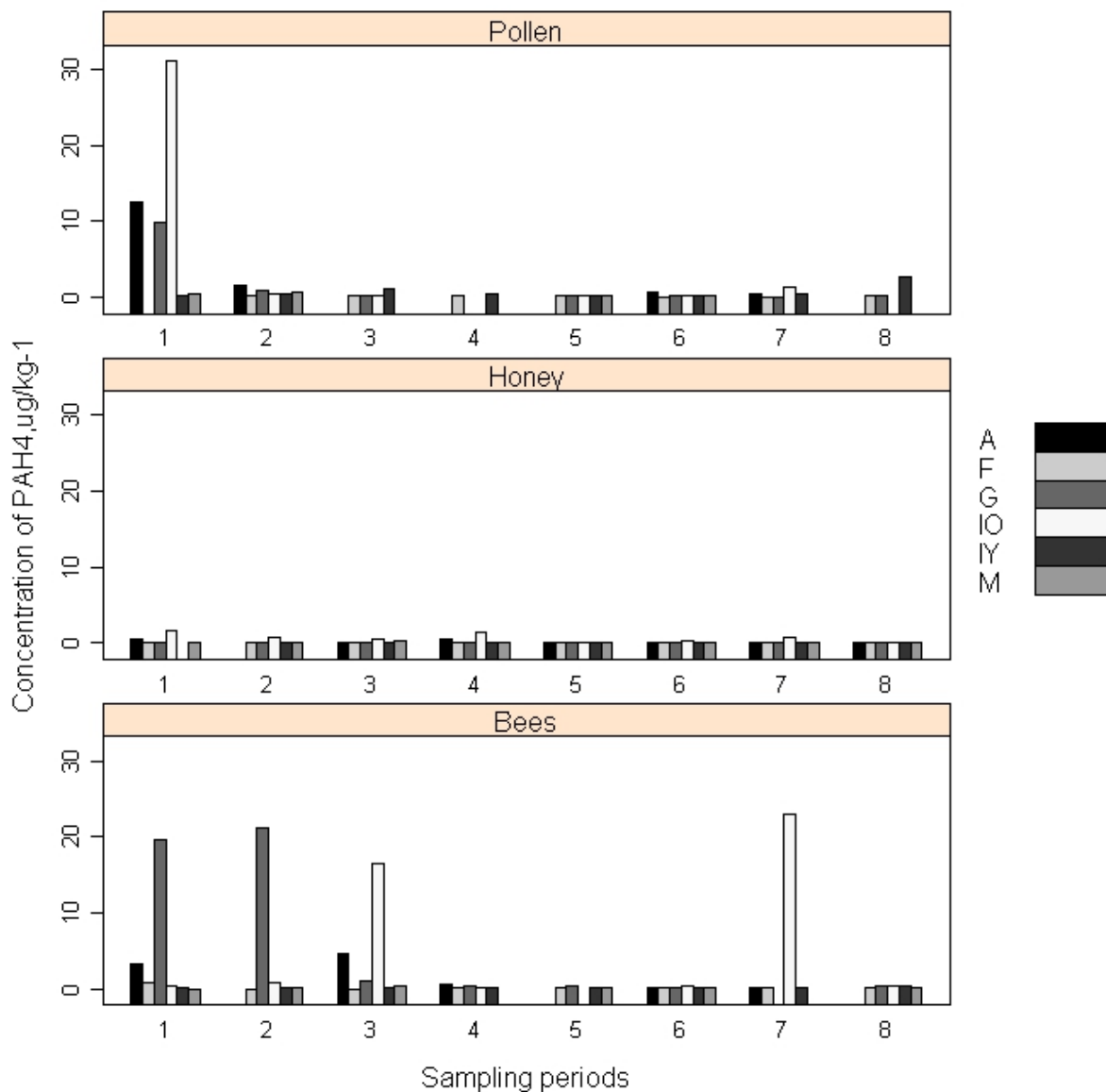


Fig. 2. PAH4 concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) measured per apiary and period (end of April and beginning of May 2008 (period 1) and 2009 (period 5), end of June and beginning of July 2008 (period 2) and 2009 (period 6), end of July and beginning of August 2008 (period 3) and 2009 (period 7), end of September and beginning of October 2008 (period 4) and 2009 (period 8)).

In another approach, the effect of *Apiary* and *Period* on PAH4 contamination was tested for each beehive matrix.

Table 2**Analysis of deviance tables on models fitted by glm.**

Models	Effects	Df	Deviance Resid.	Df	Resid.Dev	P(> Chi)
A-Fitted by GLM on all samples	NULL	122	399.13			
	<i>Apiary</i>	5	154.047	117	245.08	<0.0001
	<i>Period</i>	7	58.379	110	186.70	<0.0001
	<i>Matrix</i>	2	47.082	108	139.62	<0.0001
	<i>Apiary:Matrix</i>	10	30.739	98	108.88	<0.0001
	<i>Apiary:Period</i>	35	54.394	63	54.49	<0.0001
	<i>Period:Matrix</i>	14	13.177	49	41.31	0.5867
B-Fitted by GLM for honey matrix	NULL	45	65.502			
	<i>Apiary</i>	5	31.798	40	33.704	<0.0001
	<i>Period</i>	7	7.036	33	26.669	0.1578
C-Fitted by GLM for bees matrix	NULL	40	137.631			
	<i>Apiary</i>	5	81.191	35	56.440	<0.0001
	<i>Period</i>	7	18.736	28	37.704	0.02329

The GLM adjusted on honey samples showed that the *period* had no significant effect on the concentration of PAH4 in honey ($p > 0.05$; Table 2B). Inversely, *period* had a significant effect on the PAH4 concentration in bees ($p < 0.0001$, Table 2C), due to the peaks of pollution. Numerous data were missing in pollen samples. Pollen was collected in pollen trap installed three days before sampling and sometimes weather conditions did not allow honeybees to forage enough pollen for the analysis. The missing data made the glm model not accurate. No seasonal phenomenon appeared in these results. In our study, contamination seemed to be very punctual and linked to hive contexts. PAH contamination is major in winter, probably due to domestic heating (Motelay-Massei et al., 2007). For this study, hive samples, available only from April to October, limited the potential interest of beehive samples for a global environmental PAH contamination survey.

3.2. Exposure and sources of contamination of the different matrices

3.2.1. Contamination in the different matrices

The mean of PAH4 concentrations differed among *Apiary* samples (Table 2, $p < 0.0001$), with the highest levels of exposures in pollen (maximum = 129.41 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and bees (maximum = 73.83 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Respective means were 7.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen and 7.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in

bees. Means are statistical indicators very sensitive to extreme values. In this context, medians could be better descriptive arguments than means, showing that more samples were contaminated above $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen than in bees (respective medians: $1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$, $0.87 \mu\text{g kg}^{-1}$). Finally, concentrations of PAH4 were significantly lower in honey matrix (HSD Tukey for first global model, $p < 0.05$).

Considering the high significant interaction between the *apiary* and *matrix* effects ($p < 0.0001$, Table 2), it was not possible to conclude that pollen samples were the most contaminated. In apiary IO and G, bees presented higher levels of contamination (medians in IO are $2.27 \mu\text{g kg}^{-1}$ in bees and $1.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ in pollen). Matrices exposure varied among apiaries, which could be due to different sources of contamination around apiaries linked to different ways of exposures for bees and pollen. Crépineau-Ducoulombier and Rychen (2003) showed different PAH contamination levels in two different sites (motorway samples and airport samples) and in two different matrices ((i) grass samples mostly contaminated by PAHs found in the vapor phase in the air; (ii) soil samples mostly contaminated by high molecular weight PAHs found in the particle phase in the air).

3.2.2. Sources of contamination of the hive matrices

Plants are exposed to PAHs originating from both the atmosphere and the soil (Fismes et al., 2002). Therefore, PAH concentrations in pollen would depend on the PAH concentrations in dust deposition and on the current and former contamination of the soil. Lipophilic organic pollutants such as PAHs concentrate in organs with higher lipid content (Fismes et al., 2002). Pollen lipid contents vary depending on the species, reaching 25.4% in the melliferous plant *Brassica napus* (Evans et al., 1991). Exposure to several sources of PAH contamination and potentiality to PAH bioaccumulation could explain high levels of contamination measured in pollen.

Flying bees are exposed to atmospheric dust pollutants and contact contamination when gathering pollen from flowers. The peaks of contamination could be linked to their hairy bodies and therefore their ability to hold easily residues they come into contact with (Porrini et al., 2003). Such characteristic determines good potentiality of bees as a bioindicator to detect peaks of pollution. Besides, bees feed on pollen and nectar and so, when soil and plant are contaminated, they could be exposed to chronic contamination by ingestion (Raes et al., 1992). However, there was no evidence of a transfer of contamination from

pollen to bees (Pearson correlation, $p > 0.05$). Our study confirms conclusion of [Perugini et al. \(2009\)](#) on bee ability to reflect change in PAH concentrations, even when the beehive is located in a preserved site, far from any possible pollution source. Finally, honeybees can contaminate themselves by collecting anthropic substances (road tar, ...) instead of mixing resins from trees to product their propolis ([Moret et al., 2010](#)).

Contamination in honey can be inherited from its constituents (nectar and pollen) or transferred by bees when transforming nectar. Nectar, the basic constituent of honey, should receive low PAH contamination in plants because of its low lipid content and then its poor potentiality to bioaccumulate PAHs ([Fismes et al., 2002](#)). Pollen has higher PAH concentrations, but it makes up a negligible part in honey composition. There was no evidence of transfer of PAH4 from bees or pollen to honey, at the same sampling period or from one period to the next one (Pearson correlation, $p > 0.05$). In addition, a peak of contamination in pollen or bees would not increase the contamination of honey at the next period. Besides, honey exposure to contaminants is also highly species specific and could depend on the botanical origin. Indeed, PAH translocation from soil to plant is species specific ([Parrish et al., 2006](#)) and the morphology of flowers determines nectar exposure to atmospheric contamination ([Perugini et al., 2009](#)).

Finally, few reports connected the PAH concentrations in bee products with the use of smoke by beekeepers during manipulations in hives ([Perugini et al., 2009](#); [Moret et al., 2010](#)). It seemed to represent a possible source of contamination in honeybee and it could explain the PAH contamination background noise found in our honey samples (min = $0.02 \mu\text{g kg}^{-1}$; max = $5.80 \mu\text{g kg}^{-1}$; [Fig. 1](#)). However this contamination route could not explain the concentrations measured in foraging bees and pollen sampled before opening the hives to collect honey and so before smoking the hives.

3.3. Exposure and sources of contamination around the different apiary sites

The PAH4 concentrations were significantly influenced by the *apiary* effect for all beehive samples ([Fig. 2](#)). In honey samples, GLM and Tukey test highlighted the differences between the most polluted site IO and the other sampling sites ([Table 2B](#), $p < 0.05$). The mean and median levels of contamination for PAH4 were $2.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $2.35 \mu\text{g kg}^{-1}$ in IO honey, while they decreased to $0.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ in the second most contaminated site A ([Fig. 3A](#)).

In bee samples, PAH4 were detected at significant lower concentrations in apiaries F, M and IY (Fig. 3B respective means for PAH4: 0.73 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0.74 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 0.35 $\mu\text{g kg}^{-1}$) than in apiaries A, G and IO (respective means for PAH4: 4.91 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 13.42 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 22.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The *apiary* effect was highly significant (Table 2C, $p < 0.001$) and Tukey test showed significant difference between the contaminated bees from IO-G and the bees from the group F-IY-M ($p < 0.001$). Maliszewska-Kordybach et al. (2009) reported that the concentrations of higher molecular weight PAHs in soils were affected by the landscape type. Such conclusion is particularly confirmed in our study for the bee matrix.

Apiaries A and G were near expressway (2 x 2 roads) and near the center of two middle cities (3500 and 7800 inhabitants for apiary A and apiary G, respectively). Apiaries F and M are far from road traffic and built-up area. Such results were similar to the recent results of Moret et al. (2010). They showed that propolis samples characterized by the lowest PAH content came from site far from roads and industrial sites. At the same, Maliszewska-Kordybach et al. (2009) concluded that the concentration of higher molecular weight PAHs increased in territories of intensive urbanization/industrialization. On the contrary, Perugini et al. (2009) have shown no significant difference of PAH concentrations between honey and bee samplings from urban areas and from wildlife reserves. The apiary IY was located in the center of the district (5000 inhabitants). However, industrial activities and road traffic are trivial on this little island (23 km^2), explaining the low PAH concentrations in matrices.

The landscape context of the apiary IO was similar to the apiary IY, but this site showed the highest values for each matrix and for the four PAHs for all the periods over the two years. In the Isle of Ouessant, it was known that honeybees used hydrocarbon particles that could explain one part of the PAH contamination and particularly the high concentrations found in foraging bees. Nevertheless atmospheric deposition seemed to be the major source of contamination especially by intensive boat traffic in the « rail d'Ouessant ». This contamination has been described by Garban et al. (2002). These authors have shown that the mean PAH concentration at the Isle of Ouessant (54.6 ng L^{-1} water) was generally higher than at other rural sites and the presence of the « rail d'Ouessant » was considered as a potential source.

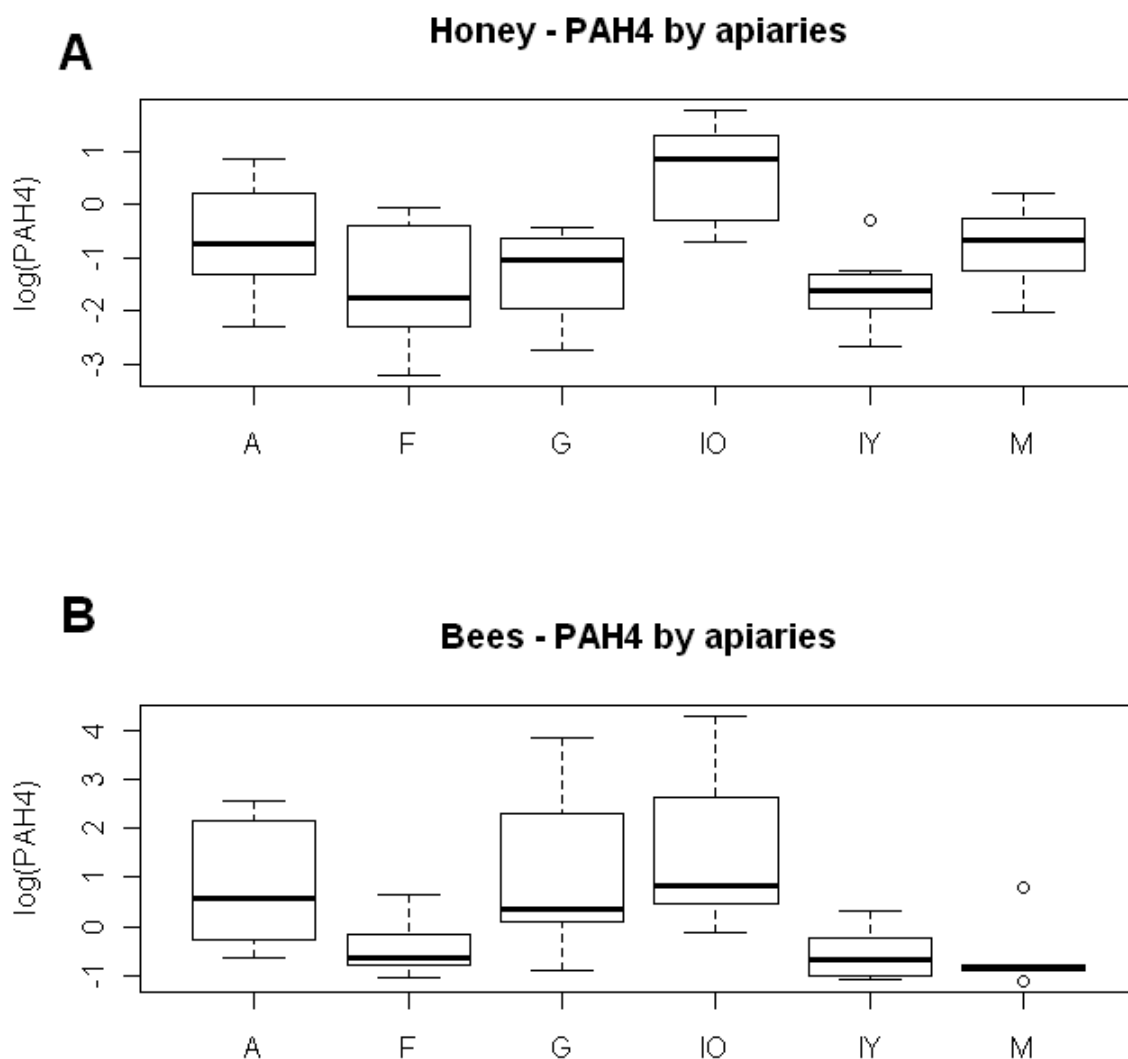


Fig. 3. Boxplot of $\log(\text{PAH4})$ by *apiary* (apiaries A, F, M in hedgerow landscape; apiary G in cultivated landscape; apiaries IO and IY on islands) in honey (2-A) and bees (2-B) matrices.

4. Conclusions

Bee sample presented numerous advantages required for a good bioindicator. It is sensitive to low concentration in PAHs as to peaks of contamination. It was the best beehive matrix to differentiate *apiary* and *period* effects. Finally, bee sample collection did not depend too much on weather conditions (on contrary to pollen), so bees seem to be the best beehive matrix for monitoring environmental PAH contamination.

Our study showed that PAH4 beehive matrices contamination was influenced by the landscape context. It would be particularly informative to analyze samples collected from urban apiaries, PAH contamination increasing with anthropogenic activities (Garban et al., 2002).

Acknowledgment

We thank all the beekeepers for their cooperation and their time. We thank also Monique L'Hostis, Suzanne Bastian, Bénédicte Pouleur and Jean-Michel Allard from ONIRIS for the field sampling.

This study was supported by the European Union through European Agricultural Guidance Guarantee Fund projects.

References

- Balayiannis, G., Balayiannis, P., 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 462-470.
- Basu, N., Scheuhammer, A.M., Bursian, S.J., Elliott, J., Rouvinen-Watt, K., Chan, H.M., 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. *Environ. Res.* 103, 130-144.
- Chauzat, M-P., Martel, A-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J-P., 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 103-111.
- Commission Regulation (EC) No. 108, 2005. Official Journal of the European Communities, 2005, L34, 43-45.
- Crépineau-Ducoulombier, C., Rychen, G., 2003. Assessment of soil and grass Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) contamination levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23, 345-348.
- Dobrinas, S., Birghila, S., Coatu, V., 2008. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *J. Food Comp. Analys.* 21, 71-77.

- Dong, T.T.T., Lee, B-K., 2009. Characteristics, toxicity, and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in road dust of Ulsan, Korea. *Chemosphere* 74, 1245-1253.
- EC (European Commission), 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food.
- EFSA, 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in food chain. *The EFSA Journal* 724, 1-114.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1991. Quantitative analysis of lipids and protein from the pollen of *Brassica napus* L. *Plant Sci.* 73, 117-126.
- Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P., Morel, J.L., 2002. Soil to root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 31: 1649-1656.
- Garban, B., Blanchoud, H., Motelay-Massei, A., Chevreuil, M., Ollivon, D., 2002. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmosph. Environ.* 36, 5395-5403.
- Hodgeson, J.W., 1990. Method 550.1 Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with couple ultraviolet and fluorescence detection. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office Of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268, 1-22.
- Kevan, P.G., 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74, 373-393.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Ed. Lavoisier Tec & Doc, Paris.
- Leita, L., Muhlbachova, G., Cesco, S., Barbattini, R., Mondini, C., 1996. Investigation of the use of honeybees and honey bee products to assess heavy metals contamination. *Environ. Monit. Assess.* 43: 1-9.
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., Klimkiewicz-Pawlas, A., 2009. Concentrations, sources, and spatial distribution of individual polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils in the Eastern part of the EU: Poland as a case study. *Sci. Total Environ.* 407, 3746-3753.
- Moret, S., Purcaro, G., Conte, L.S., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in propolis and propolis-based dietary supplements from the Italian market. *Food Chem.* 122, 333-338.

- Motelay-Massei, A., Ollivon, D., Garban, B., Tiphagne-Larcher, K., Zimmerlin, I., Chevreuil, M., 2007. PAHs in the bulk atmospheric deposition of the Seine river basin: source identification and apportionment by ratios multivariate statistical techniques and scanning electron microscopy. *Chemosphere* 67, 312-321.
- Parrish, Z.D., White, J.C., Isleyen, M., Gent, M.P.N., Iannucci-Berger, W., Eitzer, B.D., Kelsey, J.W., Incorvia Mattina, M., 2006. Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere* 64, 609-618.
- Perugini, M., Di Serafino, G., Giacomelli, A., Medrzyck, P., Sabatini, A.G., Persano Oddo, L., Marinelli, E., Amorena, M., 2009. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7440-7444.
- Ponikvar, M., Snajder, J., Sedej, B., 2005. Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂¹. *Apidologie* 36, 403-409
- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E., Celli, G., 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta* 38, 63-70.
- R Development Core Team, 2010. *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.*
- Raes, H., Cornelis, R., Rzeznik, U., 1992. Distribution, accumulation and depuration of administered lead in adult honeybees. *Sci. Total Environ.* 113, 269-279.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., de Almeida, M.V., Gerenutti, M., Apon, B.M., 2007. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chem.* 101, 1719-1726.
- Tao, S., Cui, Y.H., Xu, F.L., Li, B.G., Cao, J., Liu, W.X., Schmitt, G., Wang, X.J., Shen, W.R., Qing, B.P., Sun, R., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *Sci. Total Environ.* 320, 11-24.
- Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M., 2007. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chem.* 103, 325-330.
- van der Schalie, W.H., Gardner Jr., H.S., Bantle, J.A., De Rosa, C.T., Finch, R.A., Reif, J.S., Reuter, R.H., Backer, L.C., Burger, J., Folmar, L.C., Stockes, W.S., 1999. Animals as

- sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107, 309-315.
- Veyrand, B., Brosseaud, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *J. Chrom. A.* 1149, 333-344.
- Wang, X.-C., Zhang, Y.-X., Chen, R.F., 2001. Distribution and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in sediments from Boston Harbor, United States. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1139-1149.

2.3. Données complémentaires

2.3.1. Interprétation des résultats du dosage des HAPs à 3, 4 et 5 cycles aromatiques

2.3.1.a. Contexte et objectifs

Si l'article publié dans *Chemosphere* ([Lambert et al., 2012b](#)) n'exploite que les résultats relatifs à la somme des 4HAPs (Benzo[a]anthracène (BaA), Benzo[a]pyrène (BaP), Benzo[b]fluoranthène (BbF) et Chrysène (Ch)) recommandés par le Comité des Contaminants dans les Chaînes Alimentaires ([EFSA, 2008](#)), les dosages dans les échantillons prélevés ont concerné les seize HAPs recommandés par l'APE.

Quelques études ont par ailleurs mis en évidence des différences de distribution des HAPs en fonction de leurs poids moléculaires, de la matrice considérée et du site d'échantillonnage. [Perugini et al. \(2009\)](#) ont ainsi montré que la contamination des abeilles et du miel par les HAPs était majoritairement liée aux HAPs à 3 cycles aromatiques (93 % dans les abeilles et 57 % dans le miel), puis à 4 cycles aromatiques (6 % dans les abeilles et 43 % dans le miel) et enfin à 5 cycles aromatiques (1 % dans les abeilles et 0 % dans le miel). La même équipe ([Perugini et al., 2012](#)) a montré que la contamination élevée des abeilles par les HAPs dans des aires naturelles était liée aux concentrations élevées en HAPs à 3 cycles aromatiques, et plus particulièrement au phénanthrène. La comparaison de la contamination par les HAPs de sols agricoles et des végétaux associés ([Tao et al., 2004](#)) a montré que les HAPs à haut poids moléculaire étaient majoritaires dans le sol alors que les HAPs à faible poids moléculaire étaient majoritaires dans les végétaux, en lien notamment avec leurs différences de solubilité, de volatilité et de biodisponibilité. Au sein même des végétaux, la distribution en HAPs est variable et liée au mode d'exposition des différentes parties végétales, les concentrations en HAPs étant en moyenne 6,5 fois plus élevées dans les parties aériennes que dans les racines.

Sans considérer la totalité des HAPs dosés lors de notre étude, l'objectif de cette partie est de comparer la contamination des abeilles, du miel et du pollen par des HAPs de masses moléculaires (et donc d'origine) différentes, en fonction de la matrice, du paysage environnant et de la période de prélèvement : deux HAPs à 3 cycles aromatiques (Anthracène

(A) et Phénanthrène (Ph)), quatre HAPs à 4 cycles aromatiques (BaA, Ch, Fluoranthène (Fl) et Pyrène (Py)) et deux HAPs à 5 cycles aromatiques (BaP et BbF). Pour des raisons analytiques liées au laboratoire ayant réalisé les dosages, l'anthracène et le phénanthrène n'ont été dosés que dans les échantillons de l'année 2009 des six ruchers prélevés, soit pour les périodes 5, 6, 7 et 8. Cette partie ne considère donc que les résultats de l'année 2009 pour les huit HAPs sus-cités.

2.3.1.b. Résultats et discussion

Les concentrations déterminées pour les différents HAPs dans les trois matrices apicoles pour chacun des ruchers sont présentées dans le [tableau 3](#).

Tableau 3. Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) en HAPs à 3 cycles (Anthracène (A) et Phénanthrène (Ph)), à 4 cycles (Benzo[a]anthracène (BaA), Chrysène (Ch), Fluoranthène (Fl) et Pyrène (Py)) et à 5 cycles (Benzo[a]pyrène (BaP) et Benzo[b]fluoranthène (BbF)) dans les abeilles, le miel et le pollen pour chaque rucher pour l'année 2009 toutes périodes confondues.

matrice	rucher	HAPs à 3 cycles				HAPs à 4 cycles		HAPs à 5 cycles	
		A	Ph	BaA	Ch	Fl	Py	BaP	BbF
abeilles	A	0,148	0,581	0,128	0,284	0,753	1,746	0,091	0,136
	F	0,124	1,241	0,084	0,253	0,849	1,987	0,075	0,094
	G	0,047	0,539	0,119	0,483	1,320	2,597	0,125	0,262
	M	0,070	0,703	0,049	0,200	0,793	1,943	0,046	0,099
	IY	0,050	0,638	0,105	0,266	0,733	2,216	0,135	0,142
	IO	0,768	4,157	2,136	12,202	11,893	6,333	3,610	8,001
miel	A	0,398	1,860	0,168	0,164	2,108	1,407	0,036	0,058
	F	0,045	0,323	0,088	0,135	0,411	0,289	0,035	0,061
	G	0,027	0,244	0,082	0,151	0,495	0,300	0,028	0,055
	M	0,039	0,272	0,124	0,219	0,862	0,497	0,043	0,081
	IY	0,035	0,050	0,037	0,073	0,087	0,073	0,023	0,041
	IO	0,050	0,360	0,212	0,566	0,755	0,552	0,157	0,291
pollen	A	0,348	7,333	0,463	0,916	3,777	2,160	0,355	0,525
	F	0,320	4,656	0,110	0,338	1,635	0,852	0,089	0,121
	G	0,315	1,815	0,152	0,487	1,397	0,908	0,112	0,178
	M	0,350	7,462	0,152	0,419	4,927	1,687	0,094	0,144
	IY	0,320	3,371	0,685	1,080	1,711	1,082	0,755	0,837
	IO	0,322	7,344	0,310	1,207	3,033	1,542	0,227	0,609

Les paramètres statistiques relatifs aux concentrations des huit HAPs considérés sont présentés dans le [tableau 4](#).

Tableau 4. Paramètres statistiques (minimum, maximum, moyenne, médiane et écart type) établis pour les concentrations ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) en HAPs à 3 cycles (Anthracène (A) et Phénanthrène (Ph)), à 4 cycles (Benzo[a]anthracène (BaA), Chrysène (Ch), Fluoranthène (Fl) et Pyrène (Py)) et à 5 cycles (Benzo[a]pyrène (BaP) et Benzo[b]fluoranthène (BbF)) dans les abeilles, le miel et le pollen pour l'année 2009 toutes périodes et tous sites confondus.

matrice	paramètres	HAPs à 3 cycles		HAPs à 4 cycles				HAPs à 5 cycles	
		A	Ph	BaA	Ch	Fl	Py	BaP	BbF
abeilles	Minimum	0,047	0,539	0,049	0,202	0,733	1,746	0,046	0,094
	Maximum	0,768	4,157	2,136	12,202	11,893	6,333	3,610	8,001
	Moyenne	0,201	1,310	0,437	2,282	2,724	2,804	0,680	1,456
	Médiane	0,097	0,670	0,112	0,275	0,821	2,102	0,108	0,139
	Ecart type	0,256	1,295	0,760	4,438	4,105	1,601	1,310	2,928
miel	Minimum	0,027	0,050	0,037	0,073	0,087	0,073	0,023	0,041
	Maximum	0,398	1,860	0,212	0,566	2,108	1,407	0,157	0,291
	Moyenne	0,099	0,518	0,118	0,218	0,786	0,519	0,054	0,098
	Médiane	0,042	0,298	0,106	0,157	0,625	0,398	0,036	0,059
	Ecart type	0,134	0,608	0,058	0,162	0,641	0,426	0,046	0,087
pollen	Minimum	0,315	1,815	0,110	0,338	1,397	0,852	0,089	0,121
	Maximum	0,350	7,462	0,685	1,207	4,927	2,160	0,755	0,837
	Moyenne	0,329	5,330	0,312	0,741	2,747	1,372	0,272	0,402
	Médiane	0,321	5,994	0,231	0,701	2,372	1,312	0,170	0,352
	Ecart type	0,014	2,208	0,206	0,340	1,293	0,469	0,236	0,272

La matrice miel présente les niveaux moyens de contamination par les huit HAPs les plus faibles. Les matrices pollen et abeille présentent les concentrations moyennes en HAPs les plus élevées avec des différences en fonction du HAP considéré ([Figure 15](#)). Les trois matrices présentent un pic de contamination pour le rucher IO à la période 7, ce pic étant très marqué et le plus important pour la matrice abeille ([Figure 15](#)). En écartant ce pic de contamination de l'analyse, la matrice pollen apparaît comme la matrice la plus contaminée par les huit HAPs ce qui est sensiblement différent de la conclusion apportée par l'analyse seule de la somme des 4HAPs qui montrait que l'abeille pouvait être considérée comme la matrice la plus appropriée pour évaluer la présence des HAPs dans l'environnement ([Lambert et al., 2012b](#)). Ce résultat met en évidence les sensibilités différentes des matrices apicoles

vis-à-vis des HAPs et souligne toute l'importance du choix de la matrice lors d'une évaluation de la contamination environnementale par les HAPs.

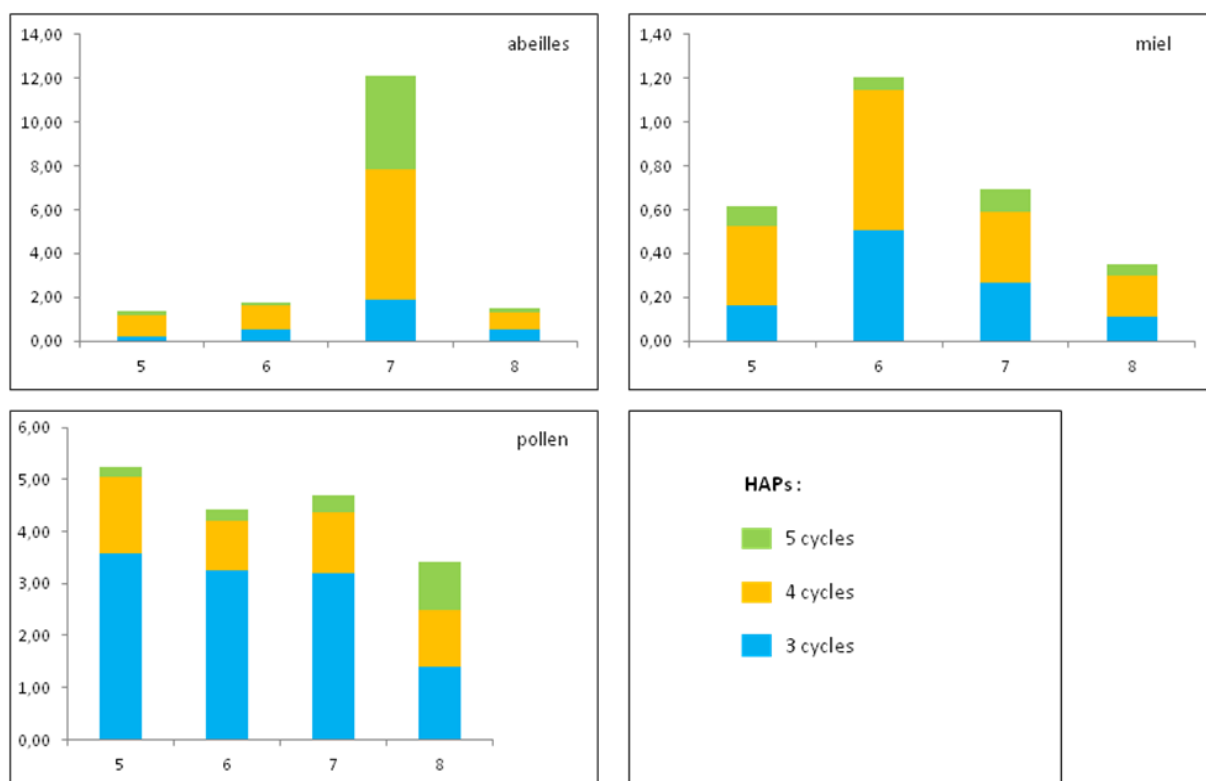


Figure 15. Profils de contamination par les HAPs (concentrations moyennes mesurées en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les HAPs à 3, 4 et 5 cycles aromatiques) au cours de la saison d'échantillonnage 2009 (période 5 : fin avril-début mai ; période 6 : fin juin-début juillet ; période 7 : fin juillet-début août ; période 8 : fin septembre-début octobre) tous ruchers confondus, dans les matrices abeilles, miel et pollen.

Quelle que soit la matrice considérée (en excluant les échantillons de la période 7 pour le rucher IO soumis à un pic de contamination important), les trois HAPs les plus représentés sont le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène soit un HAP à 3 cycles aromatiques et deux HAPs à 4 cycles aromatiques (Figure 16). Il convient de souligner qu'aucun de ces trois HAPs ne fait partie des quatre HAPs reconnus par le Comité des Contaminants dans les Chaînes Alimentaires (EFSA, 2008) comme les HAPs prioritaires à utiliser comme indicateurs dans les aliments. Il semble ainsi, qu'en dehors d'un pic de contamination par les HAPs (où les HAPs lourds sont majoritaires), le suivi de la contamination environnementale par les HAPs en utilisant les matrices apicoles doit être réalisé avec ces trois HAPs (Ph, Fl et Py) en priorité. Cette conclusion confirme les résultats de Perugini *et al.* (2012) qui ont montré que la contamination moyenne des abeilles par les HAPs dans des aires naturelles et

urbanisées était également liée à ces trois HAPs. Les HAPs lourds sont peu retrouvés dans les différentes matrices apicoles (hors pic de contamination) ce qui rejoint les conclusions de nombreuses études sur les matrices biologiques animales et végétales (Tao *et al.*, 2004 ; Parrish *et al.*, 2006 ; Perugini *et al.*, 2009 et 2012).

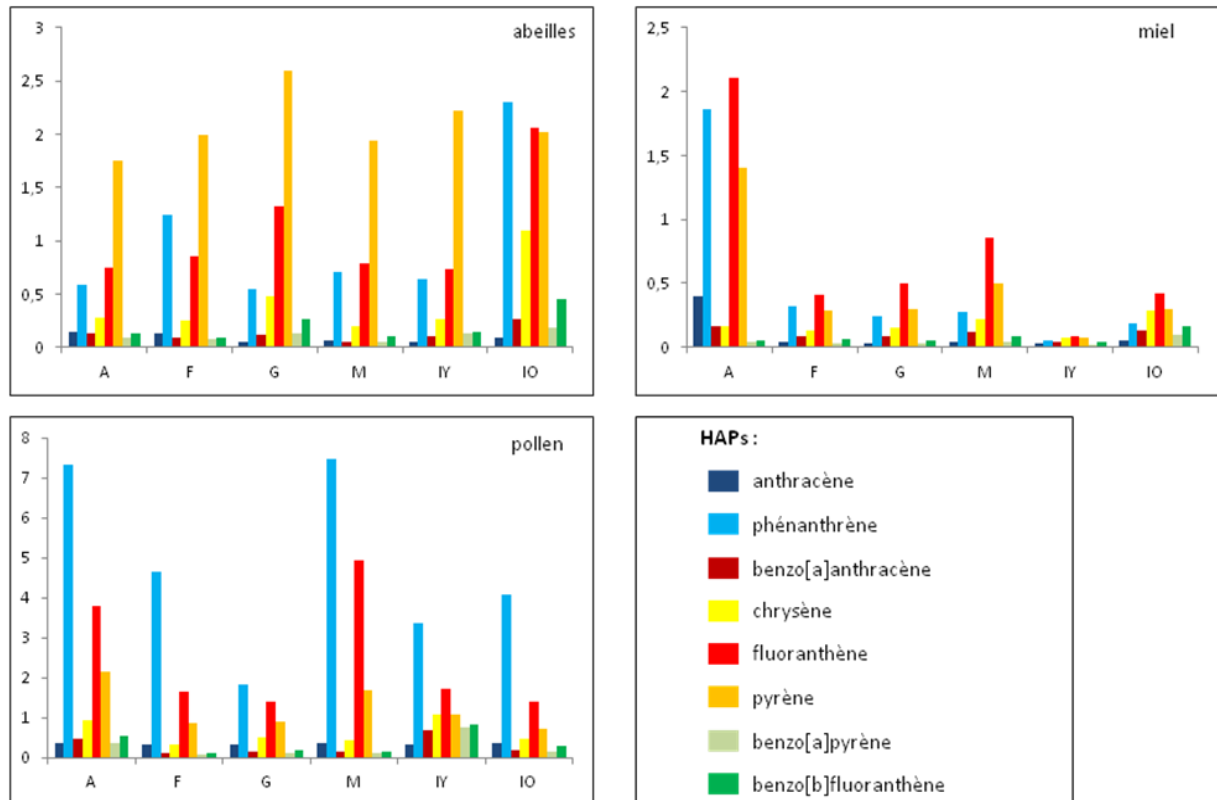


Figure 16. Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) en Anthracène, Phénanthrène, Benzo[a]anthracène, Chrysène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo[a]pyrène et Benzo[b]fluoranthène déterminées dans les abeilles, le miel et le pollen en fonction du rucher (A, F, G, M, IY, IO) pour l'année 2009 toutes périodes confondues (hors période 7 rucher IO).

Le rucher IO, même en excluant le pic de contamination de la période 7, présente un profil de contamination par les HAPs très particulier avec une contamination moyenne élevée pour l'ensemble des HAPs à 4 et 5 cycles aromatiques, notamment dans la matrice abeille (Figure 16). Ce profil de contamination est lié à une pression anthropique extérieure à l'île, et plus particulièrement à la présence du rail d'Ouessant caractérisé par un trafic maritime intensif à l'origine de contaminations atmosphériques importantes (Garban *et al.*, 2002) et de rejets d'hydrocarbures. Il est par ailleurs connu que les abeilles d'Ouessant utilisent parfois des boulettes d'hydrocarbures en remplacement de la propolis absente sur l'île.

L'analyse matrice par matrice montre des « patterns » de distributions des concentrations moyennes différents (Figure 16), notamment pour les trois HAPs majoritaires (Ph, Fl et Py). Ainsi le pyrène semble le HAP le plus fréquemment retrouvé dans la matrice abeille (hors pic de contamination), alors que c'est le fluoranthène dans la matrice miel et le phénanthrène dans la matrice pollen. Ces distributions spécifiques d'une matrice donnée sont vraisemblablement liées aux propriétés physico-chimiques de chaque HAP, aux abeilles, au miel et au pollen de trappe, mais également aux modes d'exposition de chaque matrice apicole, sans que des explications précises puissent être avancées. Ces conclusions rejoignent toutefois celles de Parrish *et al.* (2006) qui ont étudié l'accumulation des HAPs dans différentes plantes et différentes espèces de lombrics. En effet, leurs données indiquent que l'accumulation et les concentrations en HAPs sont spécifiques de l'espèce et dépendent aussi de la biodisponibilité spécifique de chaque HAP. Dans notre étude, le pollen est plus contaminé par les HAPs légers à 3 cycles aromatiques alors que les abeilles sont plus contaminées par les HAPs lourds à 4 et 5 cycles aromatiques (Figure 17).

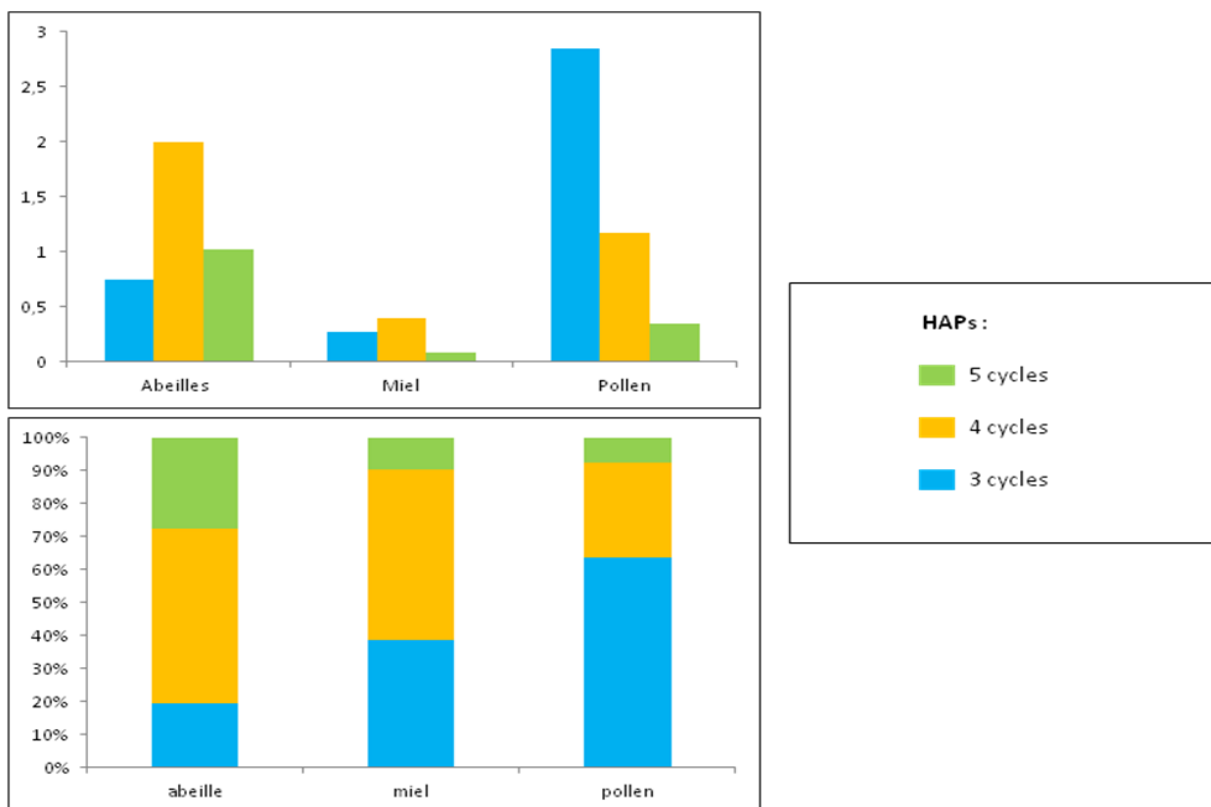


Figure 17. Proportions relatives des concentrations moyennes en HAPs, déterminées dans les matrices abeille, miel et pollen, en fonction du nombre de cycles aromatiques, tous ruchers confondus sur l'année 2009.

Un test de Student réalisé pour comparer les concentrations moyennes en HAPs à 3, 4 et 5 cycles aromatiques en fonction de la matrice, montre que : 1/ la concentration en HAPs à 3 cycles aromatiques est significativement plus élevée dans le pollen que dans les abeilles ($p\text{-value} = 0,0047$; $\alpha = 5\%$) et dans le miel ($p\text{-value} = 0,00076$; $\alpha = 5\%$) avec une concentration plus élevée dans les abeilles que dans le miel ; 2/ la concentration en HAPs à 4 cycles aromatiques est significativement plus élevée dans les abeilles que dans le miel ($p\text{-value} = 0,0064$; $\alpha = 5\%$) et dans le pollen que dans le miel ($p\text{-value} = 1,234 \cdot 10^{-5}$; $\alpha = 5\%$) ; et 3/ la concentration en HAPs à 5 cycles aromatiques est significativement plus élevée dans le pollen que dans le miel ($p\text{-value} = 0,0029$; $\alpha = 5\%$) (Figure 18).

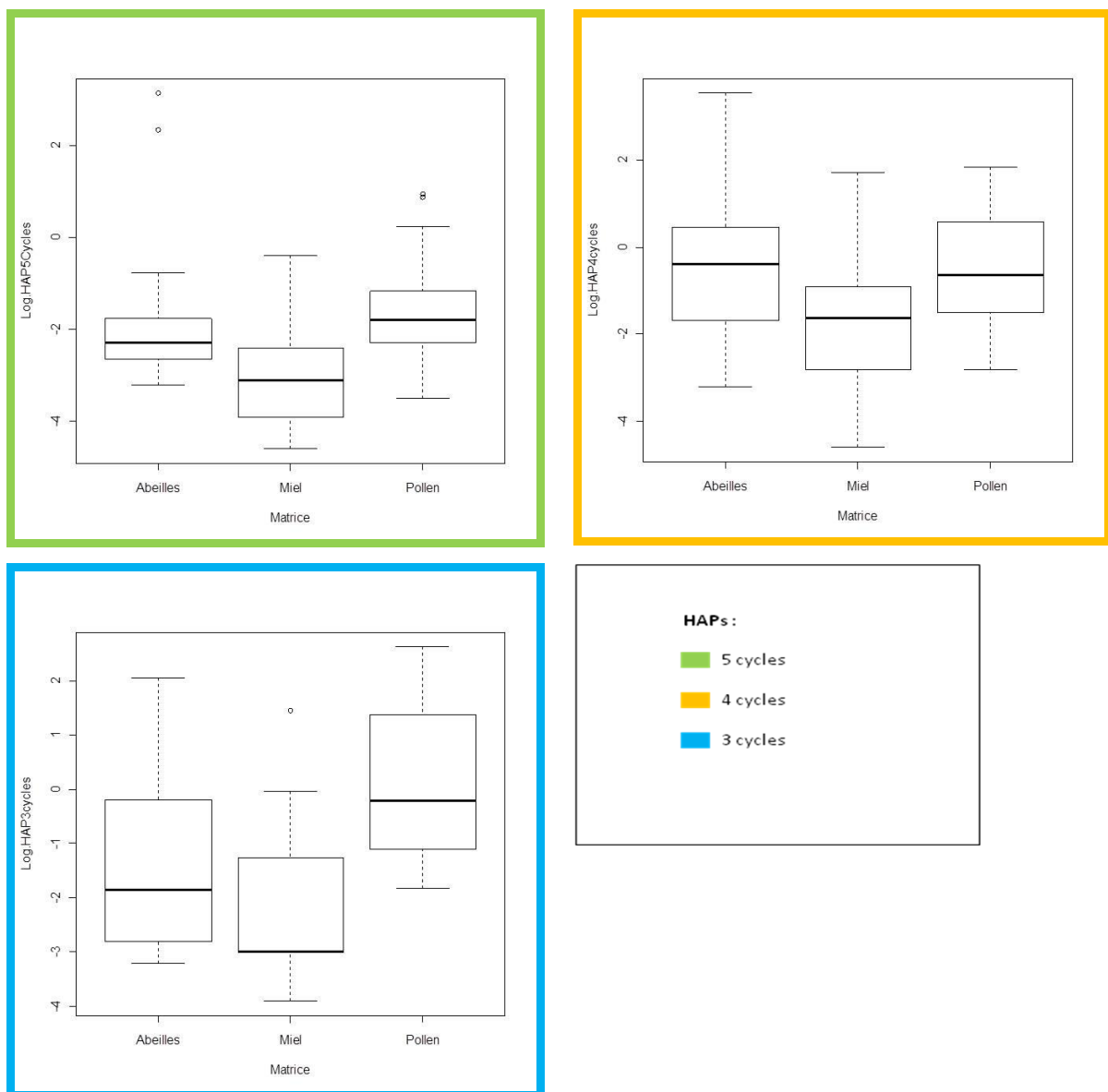


Figure 18. Boxplots des concentrations moyennes en HAPs (exprimées en log) en fonction du nombre de cycles aromatiques (3, 4 et 5 cycles) et de la matrice (abeilles, miel, pollen).

La comparaison des proportions relatives en HAPs en fonction de leurs poids moléculaires au niveau de chaque rucher (Figure 19) montre que les HAPs à 4 et 5 cycles aromatiques seraient majoritaires pour les ruchers IO et G et que les HAPs à 3 cycles seraient majoritaires pour les ruchers F et M. Ces deux derniers ruchers sont isolés de tout axe routier ou d'aires urbanisées alors que les ruchers IO et G sont soumis à une pression anthropique plus importante (Lambert *et al.*, 2012b). Ces observations sont en accord avec la bibliographie existante et les données liées à la répartition spécifique des HAPs en fonction du paysage. Les HAPs lourds sont pour la plupart présents et caractéristiques des milieux urbanisés et industrialisés, étant notamment liés aux émissions des incinérateurs de déchets, des véhicules à essence (indicateurs du trafic routier) ou du chauffage domestique. Les HAPs légers comme le phénanthrène sont plus volatiles et sont en comparaison majoritairement retrouvés dans des aires moins urbanisées (Maliszewska-Kordybach *et al.*, 2009 ; Perugini *et al.*, 2012).

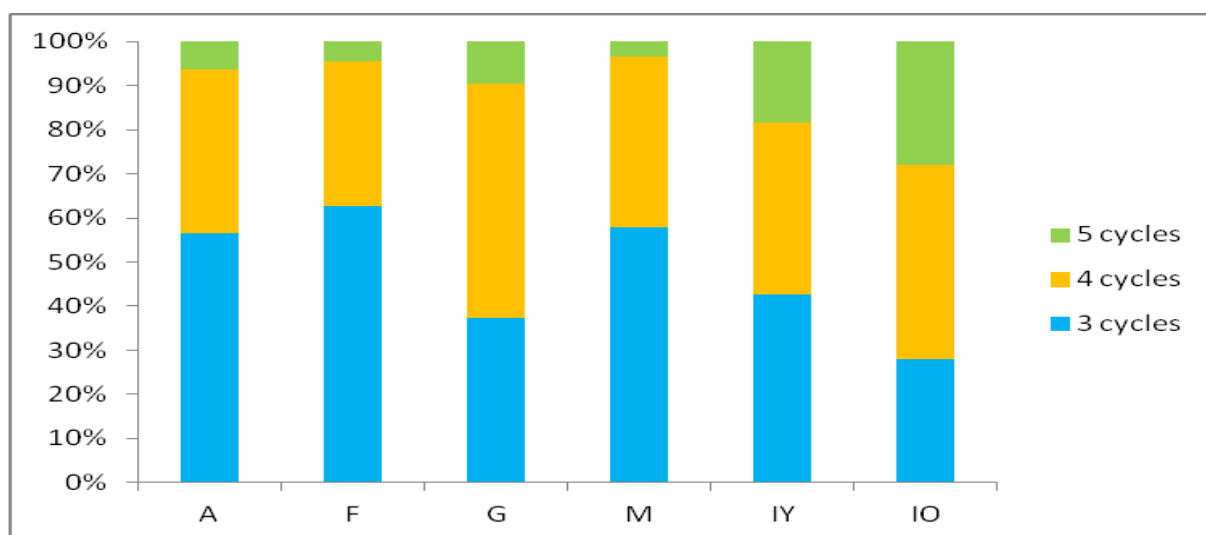


Figure 19. Proportions relatives des concentrations moyennes en HAPs dans les différents ruchers (A, F, G, M, IY et IO), en fonction du nombre de cycles aromatiques, toutes matrices confondues sur l'année 2009.

En excluant le pic de contamination très net du rucher IO à la période 7, les profils de contamination par les HAPs tout au long de la saison d'échantillonnage sont variables et dépendent de la matrice considérée (Figure 20). La matrice abeille est caractérisée par des concentrations moyennes plus élevées pour les périodes 6 et 7 qui correspondent aux périodes d'été, saisons les plus chaudes et sèches, et favorables aux contaminations par les polluants atmosphériques. Cette tendance devrait être retrouvée également dans la matrice pollen (Morgano *et al.*, 2010) mais les concentrations moyennes mesurées sont décroissantes au

cours de la saison apicole 2009. La matrice miel montre un pic net de contamination en période 6 alors que la tendance générale est à une diminution régulière de la contamination de la période 5 à la période 8. Finalement, il est difficile de dresser des profils de contamination types dans le temps à l'aide des matrices apicoles, de nombreux facteurs pouvant influencer fortement la contamination (Perugini *et al.*, 2009) : 1/ les conditions climatiques, tels que les précipitations ou les changements de température, vont plus ou moins favoriser l'activité de butinage des abeilles, et donc leur exposition aux polluants environnementaux et la récolte du pollen ou du nectar ; 2/ l'environnement proche du rucher et les activités anthropiques présentes sources d'émissions ponctuelles de HAPs ; et 3/ les espèces végétales butinées dont les caractéristiques morphologiques florales peuvent modifier l'exposition du pollen et du nectar.

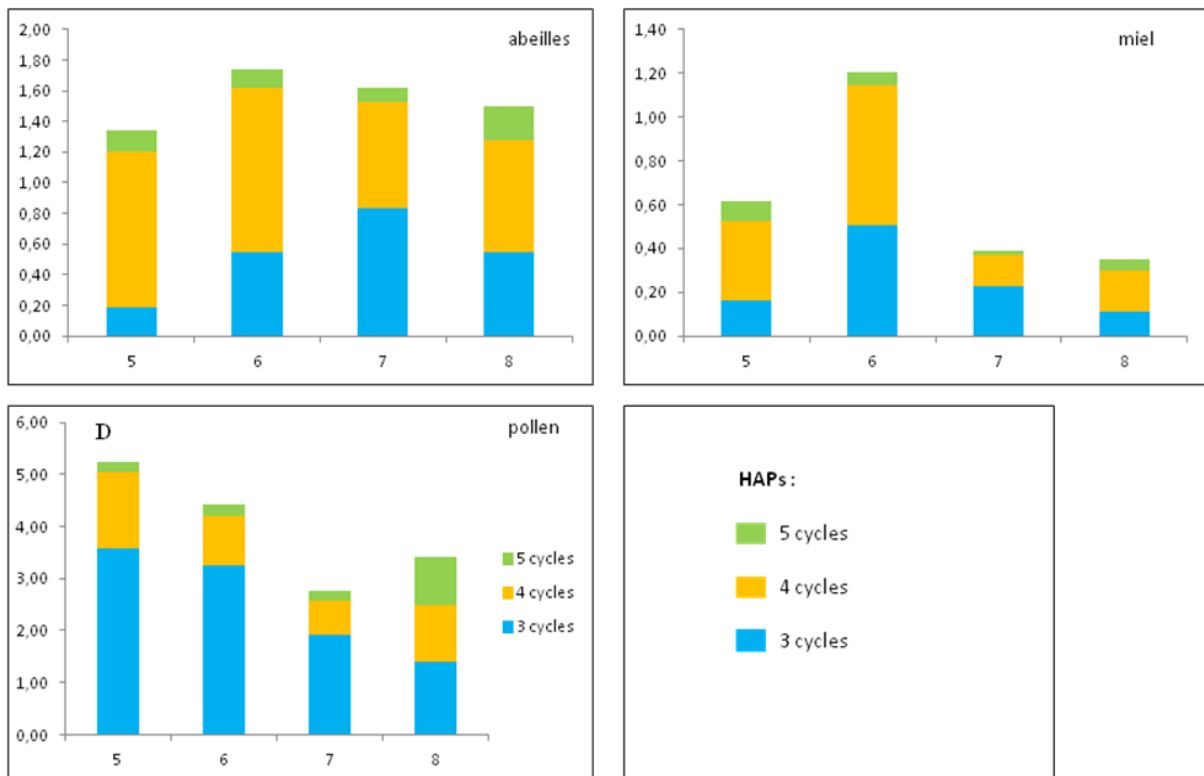


Figure 20. Profils de contamination par les HAPs (concentrations moyennes mesurées en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) pour les HAPs à 3, 4 et 5 cycles aromatiques) au cours de la saison d'échantillonnage 2009 (période 5 : fin avril-début mai ; période 6 : fin juin-début juillet ; période 7 : fin juillet-début août ; période 8 : fin septembre-début octobre) tous ruchers confondus, dans les matrices abeilles, miel et pollen (hors période 7, rucher IO).

2.3.1.c. En résumé

Les matrices apicoles sont de bons marqueurs de la contamination environnementale par les HAPs avec une sensibilité différente en fonction de la matrice considérée et du poids moléculaire des HAPs, les contaminations par les HAPs lourds étant plus importantes dans les abeilles et les contaminations par les HAPs légers plus importantes dans le pollen. Le contexte paysager et la saison ont une influence nette sur la contamination des matrices apicoles mais il reste difficile de dégager des tendances généralisables étant donné le nombre réduit de ruchers de paysages différents étudiés (n=6) et de périodes d'échantillonnage réalisées (n=4).

2.3.2. Les ruchers en ville

2.3.2.a. Contexte des analyses

Dans les échantillons d'abeilles, les concentrations en 4HAPs sont significativement plus élevées pour les ruchers A, G et IO (rail d'Ouessant) (Lambert *et al.*, 2012b). La proximité des ruchers A et G d'agglomérations et de voies express (2x2 voies), sources d'émissions importantes de HAPs, peut permettre d'expliquer cette tendance, notamment par rapport aux ruchers éloignés de zones urbanisées et d'axes routiers et par conséquent moins contaminés (F et M) (Figure 21). Bien que le rucher insulaire IY soit implanté au sein d'une zone relativement urbanisée (Figure 21), la contamination par les HAPs est faible et vraisemblablement liée à la faible activité anthropique du site (réseau routier lâche et trafic routier exceptionnel, économie liée au tourisme et à la pêche, constructions interdites dans le sud de l'île et population regroupée au nord). La contamination des matrices apicoles par les 4HAPs semble ainsi fortement influencée par le contexte paysager et augmente avec la proximité des sources polluantes (villes, zones industrielles, routes, ...).

Afin de corroborer ces résultats et suite à de nouvelles possibilités financières, les échantillons d'abeilles récoltés durant l'année 2008 sur deux ruchers implantés au sein même de la ville de Nantes (K et N) ont été analysés ultérieurement selon la méthodologie générale utilisée pour les échantillons des ruchers A, F, G, M, IO et IY (Lambert *et al.*, 2012b). Le choix des échantillons de ville s'est porté sur l'année 2008 du fait de la disponibilité de prélèvements complets sur cette année.

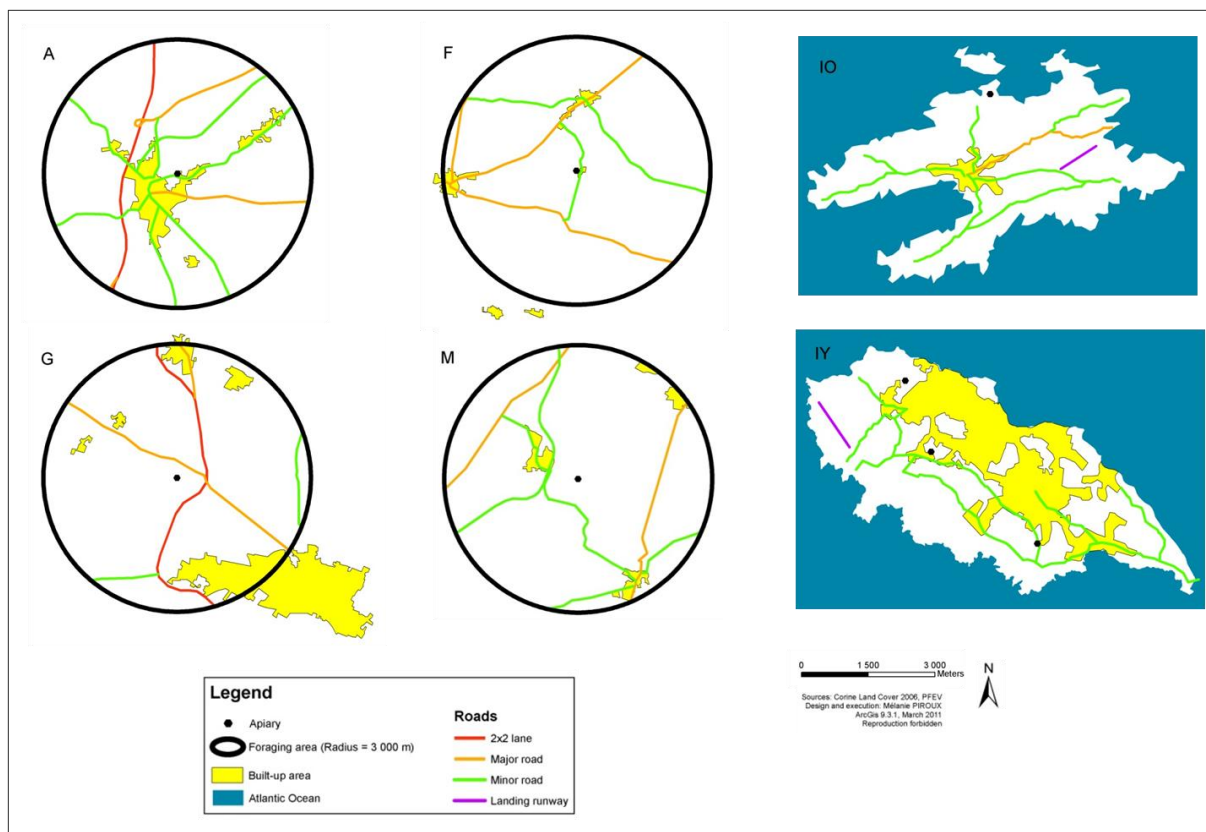


Figure 21. Représentation cartographique des zones d'activités anthropiques (agglomérations, axes routiers) des aires de butinage des ruchers A, F, G, IO, IY et M.

2.3.2.b. Résultats et discussion

Le [tableau 5](#) présente les résultats bruts du dosage des HAPs considérés dans la [partie 2.3.1.](#) pour les deux ruchers de ville (K et N) et le [tableau 6](#) récapitule les paramètres statistiques établis pour la somme des 4HAPs pour l'ensemble des ruchers suivis dans cette partie (A, F, G, IO, IY, K, M, N).

Tableau 5. Concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) en HAPs (BaP (Benzo[a]pyrène), BaA (Benzo[a]anthracène), Ch (Chrysène), BbF (Benzo[b]fluoranthène), 4HAPs (somme de BaP, BaA, Ch et BbF), A (Anthracène), Py (Pyrène), Ph (Phénanthrène) et Fl (Fluoranthène)) déterminées dans les abeilles de 2 ruchers de ville (N et K) prélevées en 2008 (périodes 1 à 4).

Période-rucher	BaP	BaA	Ch	BbF	4HAPs	A	Py	Ph	Fl
1-K	0,434	0,429	< 0,084	0,832	1,737	< 0,338	3,887	1,918	2,188
2-K	0,169	0,214	0,448	0,397	1,228	< 0,281	1,940	< 1,120	1,024
3-K	2,674	5,167	7,429	4,612	19,882	< 0,291	6,514	< 1,160	6,664
4-K	0,169	0,233	0,610	0,314	1,317	< 0,288	1,324	< 1,150	1,088
1-N	0,392	0,593	0,759	0,793	2,537	< 0,297	1,849	< 1,190	0,887
2-N	0,070	0,059	< 0,074	0,091	0,257	< 0,297	1,123	< 1,190	0,375
3-N	0,168	0,092	0,359	0,279	0,898	< 0,332	1,106	< 1,330	0,632
4-N	0,073	0,063	0,126	0,075	0,336	< 0,266	2,814	< 1,070	0,680

Tableau 6. Paramètres statistiques (minimum, maximum, moyenne, médiane et écart type) établis pour les concentrations en 4HAPs ($\mu\text{g}\text{ kg}^{-1}$) dans la matrice abeille par rucher pour l'année 2008 (toutes périodes confondues).

rucher	minimum	maximum	moyenne	médiane	écart type
A	1,77	12,78	7,76	8,73	5,57
F	0,34	1,87	0,96	0,82	0,69
G	1,04	46,21	22,74	21,85	24,32
IO	0,87	71,89	19,2	2,03	35,13
IY	0,33	0,91	0,59	0,55	0,25
K	1,23	19,88	6,04	1,53	9,23
M	0,40	2,22	1,02	0,45	1,04
N	0,26	2,54	1,01	0,62	1,06

Le test non paramétrique de Krustal-Wallis ne montre pas de différence significative de contamination par les 4HAPs entre les ruchers, même si les ruchers A, G, IO et K semblent être plus contaminés que les ruchers F, IY, M et N (Figure 22).

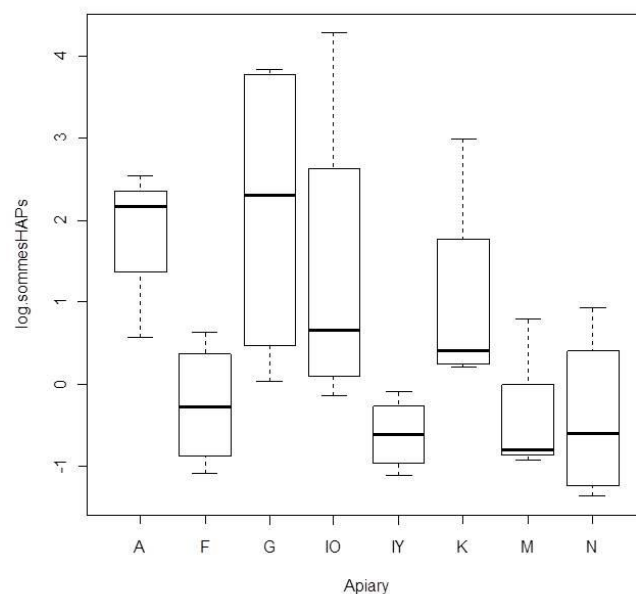


Figure 22. Boxplots des concentrations moyennes pour la somme des 4HAPs (exprimées en log) dans la matrice abeille par rucher pour l'année 2008.

Le rucher N situé en pleine ville de Nantes présente la concentration en 4HAPs la plus faible et une concentration moyenne équivalente à celles de ruchers de pleine zone rurale et éloignés de toute source potentielle d'émissions de HAPs. L'autre rucher situé au cœur de Nantes (K) est caractérisé par une concentration moyenne en 4HAPs intermédiaire entre les ruchers les moins contaminés et les ruchers les plus contaminés. Les 4HAPs regroupent des HAPs lourds et sont considérés comme des marqueurs d'émissions industrielles, d'émissions d'incinérateurs de déchets et de la circulation automobile (Yang *et al.*, 1998 ; Maliszewska-Kordybach *et al.*, 2009). Les ruchers de ville (K et N) devraient à ce titre ressortir comme les plus contaminés (Garban *et al.*, 2002), d'autant que les agglomérations à proximité des ruchers A et G, sont incomparablement plus petites en terme de densité de population, de circulation et d'industrialisation que la métropole de Nantes. De plus, les concentrations en HAPs à 5 et 6 cycles aromatiques considérés comme marqueurs d'une circulation automobile lente (Dong et Lee, 2009) ne sont pas plus élevées pour les ruchers de ville (K et N) que pour les ruchers A et G proches d'axes routiers rapides. Garban *et al.* (2002) ont montré par ailleurs que la contamination par les HAPs de certains sites, même éloignés de sources d'émission, pouvait dépendre de l'orientation des vents dominants. Ces résultats peuvent en partie expliquer les différences retrouvées lors de notre étude d'autant qu'il s'agit dans ce cas de mesures très ponctuelles (quatre prélèvements dans l'année).

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ne montre pas de différence significative de contamination par les 4HAPs entre les différentes périodes pour les échantillons d'abeilles des huit ruchers en 2008 (Figure 23). Le fait que les quatre prélèvements soient regroupés sur six mois de l'année peut expliquer ce résultat d'autant que la bibliographie montre clairement que les principales différences de contamination par les HAPs sur une année sont retrouvées entre les périodes froides d'hiver et d'automne (chauffage domestique, Motelay-Massei *et al.*, 2007) et les périodes plus chaudes du printemps et de l'été (Azimi *et al.*, 2005).

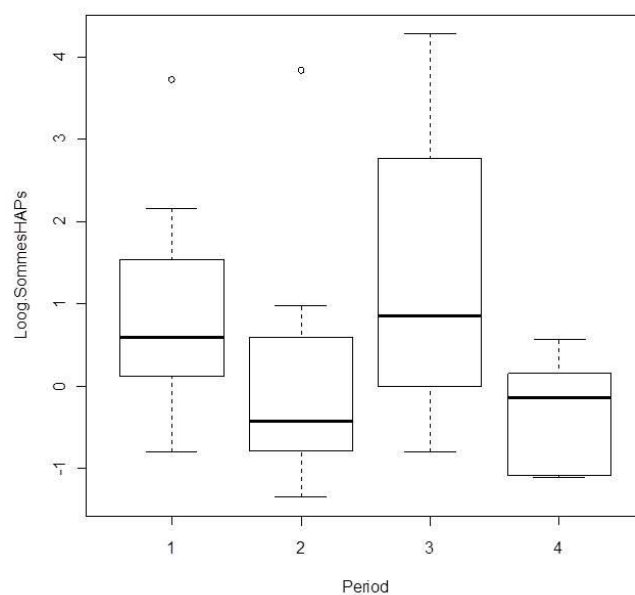


Figure 23. Boxplots des concentrations moyennes pour la somme des 4HAPs (exprimées en log) dans la matrice abeille par période (1, 2, 3 et 4) tous ruchers confondus pour l'année 2008.

La comparaison de la contamination par les HAPs légers entre les ruchers urbains (K et N) et les autres ruchers (A, F, G, IO, IY, M) est difficile dans la mesure où les résultats pour les échantillons de ville concernent l'année 2008 et ceux pour les échantillons des ruchers ruraux concernent l'année 2009. Quoi qu'il en soit, les concentrations moyennes mesurées en anthracène et en phénanthrène dans les ruchers de ville sont intermédiaires entre les ruchers les plus contaminés et les moins contaminés par ces molécules (Tableau 7). Sans infirmer ceux de la partie 2.3.1., ces résultats soulignent une nouvelle fois la difficulté de travailler avec un faible nombre de ruchers de paysages différents et des prélèvements ponctuels et éloignés dans le temps.

Tableau 7. Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) en HAPs à 3 cycles aromatiques (Anthracène et Phénanthrène) déterminées dans les abeilles des ruchers A, F, G, IO, IY et M (année 2009) et des ruchers K et N (année 2008).

HAPs à 3 cycles	rucher							
	A	F	G	IO	IY	K	M	N
anthracène	0,148	0,124	0,047	0,768	0,050	0,150	0,070	0,149
phénanthrène	0,581	1,241	0,539	4,157	0,638	0,908	0,703	0,598

2.3.2.c. En résumé

Les concentrations en HAPs mesurées dans les échantillons d'abeilles récoltés en 2008 pour deux ruchers de ville, ne mettent pas en évidence de différences significatives de contamination, ni entre les ruchers de paysages ruraux et ceux de paysages urbains, ni entre les périodes de prélèvements. Ces résultats confirment cependant le fait que la contamination par les HAPs est dépendante du contexte environnemental propre au rucher (proximité des activités industrielles et circulations automobiles, exposition aux vents, ...).

2.4. Conclusion concernant la contamination des matrices apicoles par les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les études sur la contamination des matrices apicoles par les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont peu nombreuses. Notre étude vient donc enrichir les données dans ce domaine et est unique dans le sens où elle caractérise les « patterns » de distribution des HAPs dans trois matrices, pour des ruchers à contextes paysagers différents (urbain, rural et insulaire) et sur huit périodes consécutives entre avril 2008 et octobre 2009.

Les résultats de cette étude montrent que les matrices apicoles peuvent être utilisées pour évaluer la contamination environnementale aux HAPs au même titre qu'à d'autres polluants environnementaux (Porrini *et al.*, 2003 ; Devillers *et coll.*, 2005 ; Bogdanov, 2006). Les concentrations en HAPs montrent que les abeilles et le pollen sont significativement plus contaminés que le miel. Alors que la matrice abeilles semble plus sensible aux pics de contaminations par les HAPs, les concentrations moyennes mesurées sont plus élevées dans le pollen. Si la collecte de cette dernière matrice n'était pas soumise à des contraintes fortes liées en particulier aux conditions météorologiques, le pollen serait la matrice la plus appropriée pour l'évaluation de la contamination environnementale par les HAPs. Il convient toutefois de signaler que les matrices apicoles ne pouvant être récoltées en hiver (pour ne pas mettre en péril la survie de la colonie durant cette période critique), leur utilisation comme sentinelles de la contamination par les HAPs est discutable pour une évaluation globale et annuelle d'autant qu'il a été montré que la contamination atmosphérique par les HAPs était plus importante pendant les mois les plus froids de l'année.

Alors que le benzo[a]pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène et le benzo[b]fluoranthène sont reconnus comme les HAPs prioritaires à suivre dans les aliments, du fait de leur toxicité, les concentrations de ces quatre HAPs (4HAPs) ne sont pas les plus élevées dans les matrices que nous avons étudiées, les trois HAPs majoritaires étant le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. La contamination des matrices apicoles semble donc être dominée par les HAPs à faible poids moléculaire ce qui confirme les résultats d'études menées en Italie sur les abeilles et le miel (Perugini *et al.*, 2009 et 2012). La distribution des HAPs au sein même des matrices présente des profils différents en fonction de leurs poids moléculaires. Les HAPs légers semblent en effet prépondérants dans le pollen

alors que les HAPs lourds semblent majoritaires dans la matrice abeilles. Cette différence peut éventuellement être prise en compte lors de l'évaluation de la contamination environnementale par les HAPs en fonction de leur origine, ceux-ci étant spécifiques de leurs sources d'émission (Dong et Lee, 2009).

La plupart des études montre un lien direct entre la contamination par les HAPs et le degré d'anthropisation, les concentrations les plus élevées étant mesurées dans les sites industriels, les zones urbanisées ou à proximité des axes routiers. La comparaison des concentrations en HAPs dans les huit ruchers suivis, ne montre toutefois pas de « patterns » de distribution si évidents : alors que les ruchers les plus « sauvages » apparaissent les moins contaminés et les ruchers proches d'agglomération et d'axes routiers importants semblent les plus contaminés, les ruchers au degré d'anthropisation le plus élevé (ruchers implantés dans la ville de Nantes) sont caractérisés par des concentrations intermédiaires. Cette tendance, également constatée par Perugini *et al.* (2009), confirme que les HAPs sont des polluants atmosphériques ubiquistes présents dans l'ensemble des milieux et que leurs distributions sont étroitement liées aux conditions atmosphériques (vents, températures, ...). De même, aucune différence significative de contamination entre les périodes n'a pu être mise en évidence, les concentrations élevées étant liées à des pics de contamination ponctuels. Les échantillons prélevés sur l'île d'Ouessant présentent les pics de contamination en HAPs les plus élevés et les plus fréquents en considérant les trois matrices. Cette contamination aurait une origine extérieure à l'île et serait liée à la proximité du rail d'Ouessant et au trafic maritime important (gaz d'échappements, hydrocarbures, ...).

Finalement la contamination des matrices apicoles prélevées lors de notre étude semble dépendre du contexte paysager strict de chaque rucher et les pics de contamination par les HAPs caractérisent une émission ponctuelle propre au site et/ou des conditions climatiques particulières. De manière générale, en dehors de pics de contamination difficilement explicables (hors Ouessant), la contamination par les HAPs est homogène au sein même de chaque matrice apicole étudiée.

**CHAPITRE 3 - CONTAMINATION DE TROIS
MATRICES APICOLES PAR LE PLOMB (Pb)**



3.1. Contexte des travaux

Le plomb (Pb) est un métal lourd naturellement présent dans tous les compartiments environnementaux et plus particulièrement au niveau de la croûte terrestre sous forme de minerais. Depuis l'antiquité, l'Homme l'a extrait des minerais et l'a introduit artificiellement dans tous les milieux en quantité très importante depuis la révolution industrielle. Ainsi, au plomb d'origine naturelle, s'est ajouté le plomb rejeté dans l'environnement par les activités humaines : peintures, tuyauteries, munitions, batteries automobiles (près de 70 % des utilisations du plomb actuellement), carburants automobiles, alliages, protection contre les rayonnements, masses de lestage, ... (INERIS, 2003 ; Amiard, 2011). Du fait de sa toxicité avérée pour les organismes vivants, l'Homme en particulier, de nombreux usages sont désormais interdits, notamment dans les peintures, les jouets pour enfants, les tuyaux de distribution d'eau ou les carburants automobiles. Quoiqu'il en soit, les quantités rejetées par les activités ont été telles que le plomb est encore largement répandu dans l'environnement terrestre et aquatique.

Les effets toxiques du plomb sont principalement dus à son hématotoxicité et sa neurotoxicité. Le saturnisme, maladie correspondant à une intoxication aiguë ou chronique par le plomb, touche aussi bien les mammifères, dont l'Homme, que les oiseaux. Les voies respiratoires (poussières atmosphériques et poussières domestiques) et digestives (alimentation, grit chez les oiseaux aquatiques) sont les principales voies d'exposition au plomb. De très nombreux travaux à travers le monde ont étudié l'exposition au plomb et ses effets toxiques sur les faunes terrestre et aquatique (Barak et Mason, 1990 ; Overmann et Krajicek, 1995 ; Dietz *et al.*, 1996 ; Fisher *et al.*, 2006), chez les organismes vertébrés et invertébrés (Bagley et Locke, 1967 ; Williamson et Evans, 1972 ; Nehring, 1976 ; Lewis *et al.*, 2001 ; Blus *et al.*, 1987) mais aussi chez l'Homme (Gross *et al.*, 1975 ; Flegal et Smith, 1995 ; Nriagu *et al.*, 1996).

Compte tenu des effets toxiques du plomb et donc des enjeux de santé publique animale, la surveillance de la qualité des aliments et de l'environnement est nécessaire. Pour répondre à cette problématique, de nombreuses études ont mis en évidence la fonction de biomarqueurs réalisée par certaines espèces animales et végétales. Ainsi, en fonction des

milieux et des écosystèmes, des organismes aussi différents que des lichens (Deruelle, 1996), le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) (Al-Shayeb *et al.*, 1995), le Laurier rose (*Nerium oleander*) (Aksoy et Öztürk, 1997), des larves de *Chaoborus* (Hare et Tessier, 1998), des moules et des balanes (Rainbow *et al.*, 2000), la Tortue serpentine (*Chelydra serpentina*) (Overmann et Krajicek, 1995), le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*) (Tataruch, 1995) ou le Pigeon biset urbain (*Columba livia urbana*) (Drash *et al.*, 1987) ont été utilisés pour évaluer la contamination environnementale par le plomb. Les études utilisant l'Abeille mellifère dans cet objectif sont rares et relativement récentes, et vraisemblablement liées au fait que l'abeille n'a été réellement reconnue comme une espèce sentinelle de la qualité environnementale qu'au milieu des années 1990 (Raes *et al.*, 1992 ; Cesco *et al.*, 1994 ; Leita *et al.*, 1996 ; Kevan, 1999). En revanche, les teneurs en plomb dans les aliments et les matériels domestiques faisant l'objet d'une attention toute particulière, la contamination des matrices apicoles consommables (miel, propolis, pollen) ou utilisables par l'Homme (cires) a été plus largement étudiée dès le début des années 80 (Petelinsek, 1977 ; Kerkvliet, 1983 ; Jones, 1987 ; Rowarth, 1990) et l'est encore aujourd'hui (Codreanu *et al.*, 2009b ; Bilandžić *et al.*, 2011 ; Cozmuta *et al.*, 2012). Quelques travaux actuels étudient ce rôle d'indicateur joué par l'abeille et les matrices apicoles associées pour discuter des « patterns » de contamination par le plomb en fonction de l'origine paysagère des échantillons et de la période d'échantillonnage (Morgano *et al.*, 2010 ; Perugini *et al.*, 2011). C'est dans ce contexte, que l'objectif principal de cette troisième partie est d'évaluer la contamination environnementale par le plomb des matrices apicoles prélevées dans les dix-huit ruchers partenaires des Régions Bretagne et Pays de la Loire. Les objectifs opérationnels sont 1/ de déterminer quelle semble la matrice (abeilles butineuses, pollen de trappe ou miel) la plus appropriée pour cette évaluation, 2/ de mesurer les différences de contamination en fonction de la localisation des ruchers et donc du contexte paysager et 3/ d'évaluer les différences de contamination en fonction de la saison d'échantillonnage durant les années apicoles 2008 et 2009.

La recherche du plomb dans les matrices apicoles comme polluant environnemental est le plus souvent associée à la recherche d'autres métaux, tels que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le fer (Fe) ou encore le mercure (Hg). Ces métaux, marqueurs d'activités anthropiques (industries, transports, ...), sont présents dans tous les compartiments environnementaux. A ce titre, l'abeille y est fortement exposée lors de son activité de butinage, ces métaux se trouvant dans l'air, le sol, la végétation ou l'eau. Les métaux comme le Fe, le Cu ou le Zn sont essentiels pour l'organisme, jouant un rôle dans de nombreux

processus biologiques et physiologiques, et leur toxicité n'intervient que lors d'ingestion de fortes doses. Par contre, d'autres métaux comme le Cd ou le Hg sont connus pour leurs toxicités aiguës et/ou chroniques. Le Cd et le Pb sont considérés comme les principaux métaux lourds et sont donc les plus étudiés (Bogdanov, 2006). Au même titre que le plomb, la surveillance des autres métaux dans les compartiments biologiques est donc un enjeu primordial et les matrices apicoles peuvent être utilisées à dessein (Tuzen *et al.*, 2007 ; Kalbande *et al.*, 2008 ; van der Steen *et al.*, 2011). Une brève synthèse bibliographique sera présentée sur la contamination des abeilles, du miel et du pollen par ces métaux afin d'établir la part relative du plomb dans cette contamination et d'étayer les conclusions de notre étude sur les variations spatio-temporelles des concentrations en plomb dans les matrices apicoles.

3.2. Les abeilles, le miel et le pollen, sentinelles de la contamination environnementale par le plomb (Pb)

Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans la revue **Environmental Pollution** **170**, 254-259 (Lambert *et al.*, 2012a).

Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination

Olivier Lambert^{a,*}, Mélanie Piroux^a, Sophie Puyo^a, Chantal Thorin^b, Michaëlle Larhantec^c, Frédéric Delbac^{c,d}, Hervé Pouliquen^d

^aLUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Plateforme Environnementale Vétérinaire, Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE), Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes F-44307, France

^bLUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Unité de Statistiques, Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes F-44307, France

^cClermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire «Microorganismes: Génome et Environnement», BP 10448, Clermont-Ferrand F-63000, France

^dCNRS, UMR 6023, LMGE, Aubière F-63177, France

^eLUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Laboratoire de Diagnostic Toxicologique, Atlanpole-La Chantrerie, BP40706, Nantes F-44307, France

* Corresponding author. E-mail address: olivier.lambert@oniris-nantes.fr (O. Lambert).

Résumé

Trois matrices apicoles, échantillonnées dans dix-huit ruchers de l'Ouest de la France, ont été analysées pour doser le plomb (Pb). Les échantillons ont été collectés sur 4 périodes en 2008 et en 2009. Le miel est la matrice la moins contaminée par le plomb (minimum = 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$; maximum = 0,378 $\mu\text{g g}^{-1}$; moyenne = 0,047 $\mu\text{g g}^{-1}$; écart type = 0,057). Les abeilles (minimum = 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$; maximum = 1,869 $\mu\text{g g}^{-1}$; moyenne = 0,223 $\mu\text{g g}^{-1}$; écart type = 0,217) et le pollen (minimum = 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$; maximum = 0,798 $\mu\text{g g}^{-1}$; moyenne = 0,240 $\mu\text{g g}^{-1}$; écart type = 0,200) ont montré des niveaux de contamination et des variations de contamination dans le temps équivalents mais les abeilles semblent être plus sensibles mettant

en évidence les pics de contamination en plomb. Les ruchers en paysages urbains et bocagers semblent être plus contaminés que les ruchers en paysages de cultures et insulaires. La période d'échantillonnage a eu un effet significatif sur la contamination en plomb avec des concentrations en plomb plus élevées pour les périodes sèches.

Abstract

Three beehive matrices, sampled in eighteen apiaries from West France, were analysed for the presence of lead (Pb). Samples were collected during four different periods in both 2008 and 2009. Honey was the matrix the least contaminated by Pb (min = 0.004 $\mu\text{g g}^{-1}$; max = 0.378 $\mu\text{g g}^{-1}$; mean = 0.047 $\mu\text{g g}^{-1}$; sd = 0.057). The contamination of bees (min = 0.001 $\mu\text{g g}^{-1}$; max = 1.869 $\mu\text{g g}^{-1}$; mean = 0.223 $\mu\text{g g}^{-1}$; sd = 0.217) and pollen (min = 0.004 $\mu\text{g g}^{-1}$; max = 0.798 $\mu\text{g g}^{-1}$; mean = 0.240 $\mu\text{g g}^{-1}$; sd = 0.200) showed similar levels and temporal variations but bees seemed to be more sensitive bringing out the peaks of Pb contamination. Apiaries in urban and hedgerow landscapes appeared more contaminated than apiaries in cultivated and island landscapes. Sampling period had a significant effect on Pb contamination with higher Pb concentrations determined in dry seasons.

1. Introduction

Lead (Pb) is an ubiquitous environmental pollutant released by natural sources and anthropogenic activities. During few centuries Pb was widely used for its properties (conduits, painting, ballast,...) but since the middle of the twentieth century, the Pb quantities released in the environment have increased to high levels due to industrial development, urbanization and transports. It is well known that Pb is a poison for living organisms with adverse health effects, causing physiological and behavioural damages and potentially death. Such adverse health effects have been extensively documented in wild species, birds and mammals including humans (Demayo et al., 1982; Needleman and Bellinger, 1991; Fisher et al., 2006; Pain et al., 2007; Telišman et al., 2007; Buekers et al., 2009). Considering these impacts, many Pb uses were forbidden since a few years (in particular in automobile fuels) but air and water contamination levels still remained high.

Many studies documented the contamination of water and food by Pb due to its concern, especially in human health. Many surveys have thus been conducted on edible

beehive matrices such as honey and pollen. The Pb contamination of honeybees was less documented even if they are considered as an appropriate sentinel to monitor the environmental contamination (Devillers and Pham-Delègue, 2002; Celli and Maccagnani, 2003; Porrini et al., 2003). In fact, bees are exposed to numerous pollutants during their foraging activities: (1) their hairy bodies may hold easily atmospheric residues, and (2) they may be contaminated via food resources when gathering pollen and nectar from flowers or through water. So honeybees and the associated matrices were commonly used for monitoring the contamination by chemicals such as pesticides (Ghini et al., 2004; Balayiannis and Balayiannis, 2008; Chauzat et al., 2011), polycyclic aromatic hydrocarbons (Perugini et al., 2009; Lambert et al., 2012) or heavy metals (Jones, 1987; Yarsan et al., 2007; Frias et al., 2008; Kalbande et al., 2008; Achudume and Nwafor, 2010; van der Steen et al., 2011). Recent studies indicated that honeybees were useful for monitoring the environmental contamination but more accurately to detect differences in spatial and temporal Pb environmental contaminations (Morgano et al., 2010; Perugini et al., 2011).

This study was part of the Wildlife and Ecosystems Veterinary Center from Pays de la Loire (CVFSE/ONIRIS) program concerning the use of honeybees to monitor the environmental pollution by Pb, polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in Pays de la Loire (West France). Our purpose was to investigate the contamination of 18 apiaries by Pb through analyses on 3 different matrices, foraging bees, honey and pollen over 2 beekeeping seasons. The sampling apiaries were located in different landscapes susceptible to reflect various contamination levels due to different degree of urbanization and industrialization. The temporal distribution of Pb concentrations was evaluated through 8 sampling periods and the choice of the most relevant matrices for monitoring environmental Pb contamination was discussed.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and biological matrices

Sixteen apiaries owned by sixteen volunteer beekeepers (professionals, non professionals, apiary schools, ...) of Pays de la Loire (France) were selected to participate to this survey. Five apiaries (apiaries B, D, G, J and L) were located in cultivated landscapes characterized by a high proportion of wide cultivated plots and a loose hedgerow network. Six

apiaries (apiaries A, F, H, I, M and O) were located in hedgerow landscapes characterized by large grassland areas with a heavy hedgerow network. Five apiaries (apiaries C, E, K, N and P) were located in urban landscapes. In addition, two apiaries located on small islands were selected, one (IO) in the Isle of Ouessant (Bretagne, France) and one (IY) in the Isle of Yeu (Pays de la Loire, France). These two apiaries have limited area foraging in the relation with the island size, and the Isle of Ouessant is free from great anthropogenic activities and may reflect low levels of environmental pollutants. The location of the eighteen apiaries is represented in Fig. 1.

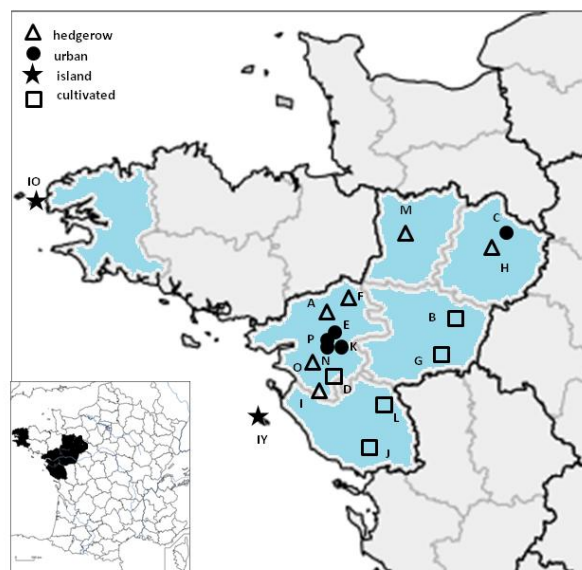


Fig. 1. Location of the sixteen continental (apiaries A to P) and two islander apiaries (apiaries IY and IO).

Three different biological hive matrices (trap pollen, foraging bees and honey) were collected from eight colonies previously randomly identified from each apiary. Samples were collected at four different times during 2008 and 2009 beekeeping seasons: (i) at the end of April and at the beginning of May 2008 (period 1) and 2009 (period 5), (ii) at the end of June and at the beginning of July 2008 (period 2) and 2009 (period 6), (iii) at the end of July and the beginning of August 2008 (period 3) and 2009 (period 7), and (iv) at the end of September and the beginning of October 2008 (period 4) and 2009 (period 8). At each period, all the samples were collected in a two weeks lapse of time.

All samples were collected from the eight hives in each apiary. The trap pollen samples were collected in pollen trap set up three days before the sampling. The sampling of foraging bees was done at each hive exit with a hand dryer Dyson®. The honeysamples were taken from several honeycombs with a cutter. The foragers collect pollen and nectar from different floral sources and may reflect specific lead contamination level for each sampled apiary colony. However the aim of this study was (1) to determine the global lead contamination of each foraging area and (2) to compare this contamination on an apiary scale (and landscape context) and not on a colony scale. So for each apiary and at each period, the samples were pooled by biological matrices (Chauzat et al., 2011). Due to the climatic shapes and so for the colony health, some samples were not carried out: in total, 117, 136 and 139 samples were collected for pollen, bees and honey respectively. The samples were placed on ice immediately after sampling and stored in a standard freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.2. Reagents and chemicals

Standards were prepared from a 1000 mg mL^{-1} Pb reference solution (Perkin–Elmer, Norwalk, CT, USA). Reagent-grade sulphuric and nitric acids (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain) were used to prepare the standards and to reconstitute ashes. Ultra pure water was obtained by using a Milli Q Academic (Millipore corporation, Bedford, MA, USA).

2.3. Instruments and equipments

All samples were put in platinum crucibles (Comptoir Lyon Alemand Louyot, Paris, France) and dry-ashed in a muffle furnace Thermicon P (Heraeus, Hanau, Germany).

For analysis, a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer 1100 B using as light source a Pb hollow-cathode tube (Perkin–Elmer) was coupled to a strip recorder AS40 (Perkin–Elmer). Graphite tubes (Perkin–Elmer) were used.

2.4. Sample preparation

Preparations of the samples were performed according to previously described methods (Miller-Ihli, 1994; Miller-Ihli and Greene, 1993; Vinas et al., 1997, 2000).

For bees and pollen, a wet weight of approximately 5 g was achieved to a stable dry weight after drying in an oven at $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ at reduced pressure. Dry bees or pollen were finely

ground with a mini-chopper. Ground dry bees or pollen (0.2 g) and 50% diluted sulphuric acid (0.5 mL) were put in platinum crucibles. Samples were dryashed in a muffle furnace in a stepwise fashion: 120 °C for 1.5 h, 350 °C for 1 h and 750 °C for 7 h. The ashes were treated with 1 mL of concentrated nitric acid and 0.2 mL of ultra pure water. Finally, the resulting solution was diluted to 10 mL with ultra pure water. Aliquots of 15 mL were injected directly into the furnace.

For honey, 1 g of wet sample together with 0.5 mL of 50% diluted sulphuric acid were put in platinum crucibles. Samples were dry-ashed in a muffle furnace in a stepwise fashion: 120 °C for 1.5 h, 350 °C for 1 h and 750 °C for 7 h. The ashes were treated with 0.25 mL of concentrated nitric acid and 0.2 mL of ultra pure water. Finally, the resulting solution was diluted to 5 mL with ultra pure water. Aliquots of 20 mL were injected directly into the furnace.

2.5. Absorption atomic measurement

Temperatures for drying, mineralization, atomization and cleaning were 100 °C, 500 °C, 2300 °C and 2700 °C, respectively. The spectral band width was 0.7 nm. The purge gas, argon, was interrupted during atomization, which improved sensitivity. Pb determination in bee, pollen or honey samples, was made by comparison with a standard curve constructed with bee, pollen or honey fortified samples.

2.6. Performances

The described method has been validated and performances have been found fit-for-purpose. Limits of detection were evaluated and were 0.007 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet sample in pollen and honey and 0.007 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry sample in bees. Limits of quantification were evaluated and were 0.020 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet sample in pollen and honey and 0.020 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry sample in bees. The linearity was assessed on five calibration levels over the range 0.02–2.00 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet pollen and honey and dry bees. Coefficient correlation (R^2) was better than 0.99 for bees, honey and pollen. Mineralization recoveries were found in-between 80 and 100%.

2.7. Statistical analysis

Statistical parameters of Pb concentrations summarising the data have been established for each matrix and for each level of sampling period or landscape.

The comparison of the Pb concentration means in pollen and bees on one hand and honey on the other hand have been realized using a Friedman test (non parametric test for paired samples).

The effects of sampling period and landscape on Pb concentrations have been modelled for each matrix through a general linear mixed effect model (glm with gamma distribution and log-link) to take into account the repeated measurement design on apiaries. Tukey's Studentized range tests (HSD Tukey), adapted to mixed effects models, have then been performed to compare Pb concentrations between sampling periods and different landscapes.

Those analyses were performed using nlme, multcomp and Rcmdr packages in R software ([R Development Core Team, 2010](#)).

To be valid, a generalised linear mixed effects model must show residuals independently and normally distributed. Those conditions have been checked for each model computed through diagnostic plots included in the R-packages (plots of deviance residuals versus fitted values and normal quantile plot of Pearson residuals, plots not shown).

For all those statistical tests, a significant effect has been considered for a first error type risk, expressed as p , under 0.05.

3. Results and discussion

The Pb concentrations were given in $\mu\text{g g}^{-1}$ wet matter for the 3 matrices. In order to compare our results to other studies, the concentrations might be expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter. The conversion was done by considering that (1) a wet bee weighed 0.1108 g and a dry bee 0.031 g, and (2) pollen consists on average of 18.5% of water (mean data determined from the samples of this study).

The distribution of Pb concentrations was highly asymmetric. For 2%, 30% and 19% of bee, honey and pollen samples respectively, the Pb concentrations were lower than the limit of detection. For 1%, 10% and 1% of bee, honey and pollen samples respectively, the Pb concentrations ranged between the limit of detection and the limit of quantification.

3.1. Contamination of different matrices for all apiaries and all sampling periods

The Pb concentrations ranged from 0.001 to 1.869 $\mu\text{g g}^{-1}$ in bees, from 0.004 to 0.798 $\mu\text{g g}^{-1}$ in pollen and from 0.004 to 0.378 $\mu\text{g g}^{-1}$ in honey. Honey samples showed the lowest levels of contamination (mean = 0.047 $\mu\text{g g}^{-1}$; standard deviation = 0.057) compared to bee samples (mean = 0.223; standard deviation = 0.217) and pollen samples (mean = 0.240 $\mu\text{g g}^{-1}$; standard deviation = 0.240). Friedman test for paired samples showed highly significant differences between Pb concentration levels in bee-pollen samples compared to honey samples ($p = 10^{-4}$). Such results were similar to those of [Bogdanov \(2006\)](#), who showed that the Pb contamination was lower in honey than in bees or propolis. [Tuzen et al. \(2007\)](#) indicated that honey might not be the most sensitive matrix for monitoring environmental contamination by Pb (and heavy metals) due to its low concentrations and all the factors which may affect exposure and contamination (plant species, floral density, weather).

The bee matrix was characterized by the highest peaks in Pb concentrations with three concentrations higher than 1.00 $\mu\text{g g}^{-1}$ while the mean concentration is quite similar to the mean concentration measured in pollen. The fact that bees seemed to be more sensitive to Pb peaks of contamination could be linked to the ways of Pb exposure. Indeed forager bees could be contaminated via two main routes: contact and food contamination. They are continuously exposed to atmospheric Pb residues during their flight and their hairy bodies may easily hold atmospheric dust ([Porrini et al., 2003](#)). This route of contamination is important when considering (1) that the mean foraging distance is 1.5 km and ranges from few metres to 10 km ([Steffan-Dewenter and Kuhn, 2002](#); [Janssens et al., 2006](#)), and (2) that forager bees realize several flights per day. Furthermore, bees might be exposed by ingestion of contaminated food when gathering pollen or nectar from flowers, or by ingestion of contaminated water. The contamination peaks should reflect in bees very occasional episodes of atmospheric contamination; they were not seen in pollen samples that potentially give a postponed image in time of these contaminations. Pb concentration levels in pollen were similar to those found in bees and could be linked to Pb atmospheric deposition on flowers. The pollen contamination by the translocation of Pb from soils to roots and aerial parts of plants did not seem to be the major way of contamination due to a low mobility of Pb from roots ([Yoon et al., 2006](#)). This might explain a low level of Pb contamination in nectar and so in honey, nectar being the basic constituent of honey.

3.2. Lead contamination according to landscape context of apiaries and to sampling periods

3.2.1. In bee matrix

The Pb concentrations in bee matrix according to the landscape context are reported in [Table 1](#).

Table 1

Statistical parameters (mean, standard deviation (sd), minimum, median, maximum, number of samples (n) and number of missing data (MD)) established for lead concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) in bees, honey and pollen for each landscape context around apiaries and for all the periods over 2008 and 2009.

Matrix	Parameters	Landscape context around apiaries			
		Hedgerow	Cultivated	Urban	Island
Bees	mean	0.202	0.177	0.292	0.242
	sd	0.119	0.097	0.342	0.272
	minimum	0.001	0.001	0.001	0.004
	median	0.174	0.193	0.208	0.200
	maximum	0.498	0.427	1.869	1.175
	n	45	40	36	15
	MD	3	0	4	1
Honey	mean	0.067	0.032	0.036	0.044
	sd	0.078	0.043	0.037	0.039
	minimum	0.004	0.004	0.004	0.004
	median	0.055	0.007	0.023	0.031
	maximum	0.378	0.189	0.152	0.131
	n	47	38	39	15
	MD	1	2	1	1
Pollen	mean	0.284	0.188	0.242	0.235
	sd	0.204	0.193	0.200	0.206
	minimum	0.004	0.004	0.004	0.004
	median	0.247	0.147	0.222	0.196
	maximum	0.798	0.795	0.740	0.746
	n	38	33	32	14
	MD	10	7	8	2

Bees collected in apiaries in urban landscapes showed the highest Pb concentrations (mean = $0.292 \mu\text{g g}^{-1}$; max = $1.869 \mu\text{g g}^{-1}$) while bees collected in apiaries in cultivated landscapes showed the lowest Pb concentrations (mean = $0.177 \mu\text{g g}^{-1}$; max = $0.427 \mu\text{g g}^{-1}$).

However, these contamination differences were not significant ($p > 0.05$, in glm model) due to high variations of measured concentrations. [Perugini et al. \(2011\)](#) reported similar results with a significant difference in Pb concentration in bees comparing stations located in urban areas and stations located in natural reserves; the highest mean concentrations ($0.52 \mu\text{g g}^{-1}$ dry matter) were detected in honeybees collected from hives for which surroundings were characterized by an intense air traffic and an intense motor vehicle circulation. Nevertheless, this maximal mean concentration was really lower than the maximal concentration measured in our study ($0.292 \mu\text{g g}^{-1}$ wet matter or $0.827 \mu\text{g g}^{-1}$ dry matter).

The Pb concentrations in bee matrix according to the sampling periods are reported in [Table 2](#).

Table 2
Statistical parameters (mean, standard deviation (sd), minimum, median, maximum, number of samples (n) and number of missing data (MD)) established for lead concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) in bees, honey and pollen for each period.

Matrix	Parameters	Sampling periods							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Bees	mean	0.118	0.335	0.231	0.436	0.202	0.153	0.160	0.130
	sd	0.112	0.155	0.100	0.465	0.097	0.092	0.079	0.046
	minimum	0.001	0.211	0.043	0.126	0.013	0.015	0.055	0.071
	median	0.114	0.273	0.239	0.250	0.207	0.142	0.125	0.109
	maximum	0.368	0.828	0.402	1.869	0.351	0.369	0.391	0.230
	n	18	18	17	18	14	18	17	16
	MD	0	0	1	0	4	0	1	2
Honey	mean	0.049	0.012	0.012	0.059	0.074	0.072	0.041	0.054
	sd	0.076	0.016	0.012	0.060	0.049	0.041	0.038	0.099
	minimum	0.004	0.004	0.004	0.004	0.010	0.031	0.004	0.004
	median	0.007	0.004	0.004	0.028	0.068	0.071	0.028	0.025
	maximum	0.264	0.069	0.041	0.157	0.190	0.212	0.116	0.378
	n	18	18	18	18	18	18	18	13
	MD	0	0	0	0	0	0	0	5
Pollen	mean	0.129	0.134	0.285	0.420	0.170	0.497	0.166	0.177
	sd	0.139	0.173	0.232	0.128	0.148	0.173	0.097	0.052
	minimum	0.004	0.004	0.004	0.292	0.004	0.262	0.010	0.103
	median	0.080	0.004	0.317	0.389	0.219	0.462	0.147	0.156
	maximum	0.585	0.485	0.795	0.740	0.426	0.798	0.412	0.257
	n	17	18	16	11	16	15	16	8
	MD	1	0	2	7	2	3	2	10

Pb concentrations in bees were significantly higher for periods from June 2008 to October 2008 (periods 2, 3 and 4). These high concentrations in spring and summer concerned only the year 2008 and this trend was not found in the following beekeeping year. [Perugini et al. \(2011\)](#) showed that Pb concentrations measured in bees, carried out once a month from May to October, were higher in July and September. This temporal distribution in contamination levels could be linked to the meteorological conditions or to the different types of plants foraged by bees.

On the contrary, [van der Steen et al. \(2011\)](#) did not show any significant difference of the bees Pb mean concentrations (min = 0.19 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter and max = 1.67 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter) neither between the landscapes (three locations with differences in industrial activities and urbanization) nor between the periods. Their results concerned samples taken from July to September which correspond to the most contaminated periods in our study (min = 0.043 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet matter or min = 0.123 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter and max = 1.869 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet matter or max = 5.297 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry matter for the periods 2, 3 and 4).

3.2.2. In honey matrix

In honey, Pb concentrations showed a huge asymmetry due to the facts that: (1) the data were left censored (30% values under the limit of detection and 10% between the limit of detection and the limit of quantification), (2) most of Pb concentrations quantified were very low (median two times lower than mean), and (3) some Pb concentrations were relatively important (max = 0.378 $\mu\text{g g}^{-1}$) providing an important standard deviation (sd = 0.057) comparing to the mean (mean = 0.047). In such situation, it was not possible to build an accurate model comparing the effects of landscape or sampling periods on Pb concentrations. So, only basic statistics for Pb concentrations in honey were given.

The Pb concentrations in honey collected in different landscape contexts were reported in [Table 1](#). These concentrations were low (min = 0.004 $\mu\text{g g}^{-1}$; max = 0.378 $\mu\text{g g}^{-1}$). Standard deviations and means were similar for all the landscapes. High values of standard deviation characterized the great dispersion of the Pb concentrations. Samples collected in hedgerow landscapes showed a mean concentration and a maximal concentration (0.067 and 0.378 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectively) two times higher than those collected in the other landscapes. Besides, honey samples from apiaries in cultivated landscapes were less contaminated: Pb was never detected in half of the samples and the mean concentration was three to eight times lower than those in other landscapes. The results might indicate a difference in Pb concentrations between

landscapes surrounding our apiaries. Such differences in rural landscapes were surprising and could be in relation to characteristics specific to each apiary (proximity with small industries or cities, ...). Differences according to the area context were also reported by [Bilandžić et al. \(2011\)](#). Their results showed that the highest Pb concentrations were found in honey from hives in most populated, urbanized and industrialized zones near highways and railways (max mean = $0.131 \mu\text{g g}^{-1}$). These results were similar to those found by [Tuzen et al. \(2007\)](#) which reported that the lowest Pb concentrations in honey were measured in regions free from industrial pollution (range from 0.0084 to $0.1058 \mu\text{g g}^{-1}$).

The Pb concentrations in honey according to the sampling periods are reported in [Table 2](#). Pb concentrations were higher in periods 5 and 6 (mean = $0.074 \mu\text{g g}^{-1}$ and mean = $0.072 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively). Furthermore, Pb concentrations were higher during the beekeeping season 2009. The highest Pb concentrations were measured on eight different apiaries; four peaks were quantified in period 1, two in period 5 and five peaks were detected in hedgerow landscapes. No explanation of these peaks of contamination in honey may be provided.

3.2.3. *In pollen matrix*

The Pb concentrations in pollen according to the landscape context are reported in [Table 1](#). Concentrations highly varied in all landscapes with standard deviations and means of the same order, especially in apiaries located in cultivated landscapes. Landscape context had no significant effect on Pb concentration. Nevertheless, differences between landscape contexts were sharper for the second year. Pollen samples from apiaries located in hedgerow landscapes seemed to be more contaminated than those from apiaries in cultivated landscapes (mean = $0.284 \mu\text{g g}^{-1}$ and mean = $0.188 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively) but the difference was not statistically significant. Many studies showed that the pollen Pb contamination was dependent on the area of sample origin. [Roman \(2009\)](#) found differences between Pb concentrations in pollen sampled in an agricultural woodland region and those in pollen sampled in a former military airfield with 0.804 and $0.835 \mu\text{g g}^{-1}$ (or 0.655 and $0.680 \mu\text{g g}^{-1}$ wet matter) during the first year and, 0.491 and $0.574 \mu\text{g g}^{-1}$ (or 0.400 and $0.574 \mu\text{g g}^{-1}$ wet matter) during the second year respectively. The former military airfield might be characterized by specific activities which could explain the high contamination. Such environmental context was not present in our study. Differences in Pb contaminations according to landscape contexts were also observed by [Morgano et al. \(2010\)](#) with the highest Pb concentrations in pollen sampled in

urban sites compared to those in rural sites. Finally the pollen Pb contamination was higher for pollens sampled in areas characterized by anthropogenic activities than in wild areas.

The Pb concentrations in pollen according to the sampling periods are reported in [Table 2](#). Sampling period had a significant effect on Pb concentrations due to punctual episodes of high contaminations. The Pb concentrations during periods 3 (mean = 0.285 $\mu\text{g g}^{-1}$), 4 (mean = 0.420 $\mu\text{g g}^{-1}$) and 6 (mean = 0.497 $\mu\text{g g}^{-1}$) were significantly higher than during the five other periods. Periods 1 and 2 were less contaminated (mean = 0.129 and mean = 0.134 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectively). [Fig. 2](#) underlines the common trend in contamination profiles for all landscapes.

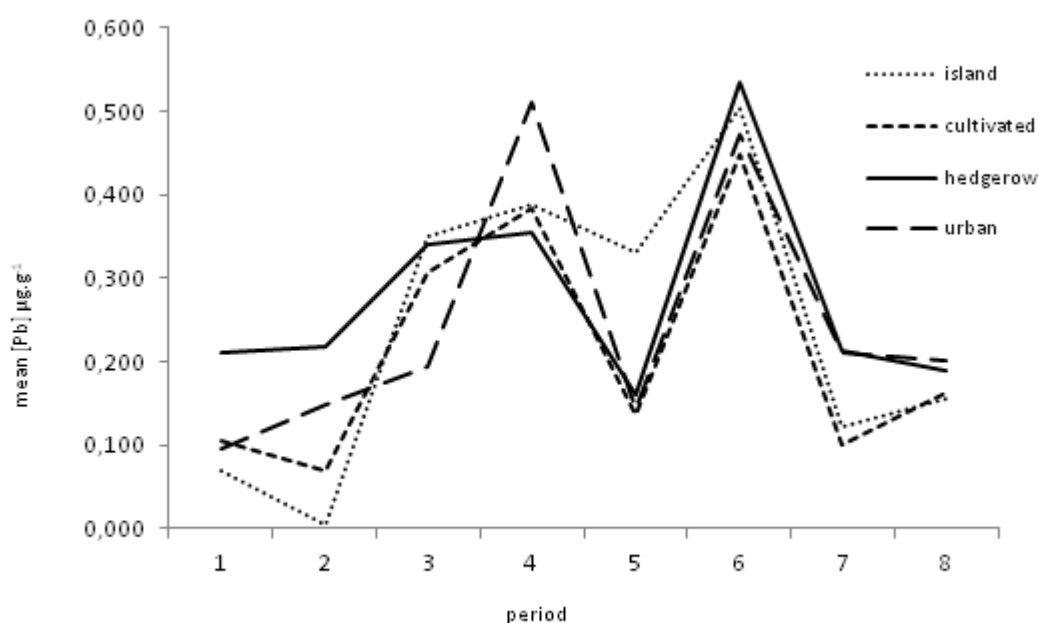


Fig. 2. Variation of lead concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) in pollen collected in apiaries from island, cultivated, hedgerow and urban landscapes over the two beekeeping seasons 2008 and 2009 (end of April and beginning of May 2008 (period 1) and 2009 (period 5), end of June and beginning of July 2008 (period 2) and 2009 (period 6), end of July and beginning of August 2008 (period 3) and 2009 (period 7), end of September and beginning of October 2008 (period 4) and 2009 (period 8)).

As shown for bees, interactions between landscape and period effects were not significant, which means that all landscapes are affected at the same time by common trend in contamination evolution. This underlines that the episodes of contamination were linked to a global phenomenon non dependant of the area considered. This is consistent with the

hypothesis of Pb contamination in pollen varying according to seasons and probably depending on meteorological conditions. [Morgano et al. \(2010\)](#) compared the contamination of pollens over a beekeeping year, from January to December, and concluded that the Pb concentrations in pollen were higher from May to September during the dry season, when the monthly pluviometric precipitation levels were lower. This hypothesis might also explain the differences in contamination levels observed in our study, the peaks corresponding to dry months (September 2008 and June in 2009).

3.3. Lead contamination in apiaries according to matrices, to landscape context and to sampling periods

The Pb contamination according to the landscape context was variable and depended on the matrix; the apiaries located in urban landscapes seemed to be more contaminated according to the bee matrix and the apiaries located in hedgerow landscapes seemed to be more contaminated according to honey and pollen matrices. If past studies showed that the differences in contamination levels might be due to the landscape context, they also revealed the relation between urbanization, industrialization or anthropogenic activities and high contaminations in the three matrices. In our study, the general trends were influenced by some contamination peaks for some apiaries. Nevertheless it might be noticed that in rural areas, the Pb concentrations in all matrices were always ranked in the following order: samples in hedgerow landscapes > samples in cultivated landscapes > samples in island landscapes. Differences in cultural practices (farming, cattle rearing,.), in the composition of ground and in floral sources might explain such results.

4. Conclusions

Whatever the landscape context and the period, honey was the least contaminated matrix. Our results did not indicate a clear relation between the contamination of honey and the contamination of bees and pollen. The contamination of bees and pollen showed similar levels and temporal variations without a clear relation. However bees seemed to be more sensitive, bringing out the peaks of a Pb contamination.

Apiaries in urban and hedgerow landscapes appeared more contaminated than apiaries in cultivated and island landscapes. This trend was influenced by the matrix and could be in relation to the overall context of each apiary (proximity with roads, industrial or built sites, .).

For all the apiaries, the influence of the sampling period was similar indicating that a common phenomenon may influence the Pb contamination overall the studied area. Pb concentrations varied across the year and were higher in dry seasons.

Finally, most samples were contaminated by Pb in our study. The concentrations were similar to those found in other studies and varied according to the landscape context and the season.

Acknowledgment

We thank all the beekeepers for their cooperation. We thank also Monique L'Hostis, Suzanne Bastian, Bénédicte Pouleur and Jean-Michel Allard from ONIRIS for the field sampling.

This study was supported by the European Union through European Agricultural Guidance Guarantee Fund projects, Nantes Métropole, le Conseil Général de Loire Atlantique, la Région des Pays de la Loire and Pullman hotels by Bee My Friend.

References

- Achudume, A.C., Nwafor, B.N., 2010. The ecological assessment of metal in local brands of honey in Southwest Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* 5, 2608–2610.
- Balayiannis, G., Balayiannis, P., 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 462–470.
- Bilandžić, N., Đokić, M., Sedak, M., Kolanović, B.S., Varenina, I., Končurat, A., Rudan, N., 2011. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chemistry* 128, 1160–1164.
- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1–18.

- Buekers, J., Steen Redeker, E., Smolders, E., 2009. Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Science of the Total Environment* 407, 3431–3438.
- Celli, G., Maccagnani, B., 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56, 137–139.
- Chauzat, M.-P., Martel, A.-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J.-P., 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 103–111.
- Demayo, A., Taylor, M.C., Taylor, K.W., Hodson, P.V., Hammond, P.B., 1982. Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 12, 257–305.
- Devillers, J., Pham-Delègue, M.H., 2002. *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Taylors & Francis, Philadelphia, PA, USA.
- Fisher, I.J., Pain, D.J., Thomas, V.G., 2006. A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological Conservation* 131, 421–432.
- Frias, I., Rubio, C., González-Iglesias, T., Gutiérrez, A.J., González-Weller, D., Hardisson, A., 2008. Metals in fresh honeys from Tenerife Island, Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 30–33.
- Ghini, S., Fernández, M., Picó, Y., Marín, R., Fini, F., Mañes, J., Girotti, S., 2004. Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 479–488.
- Janssens, X., Bruneau, E., Lebrun, P., 2006. Prévission des potentialités de production de miel à l'échelle d'un rucher au moyen d'un système d'information géographique. *Apidologie* 37, 351–365.
- Jones, K.C., 1987. Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water Air and Soil Pollution* 33, 179–189.
- Kalbande, D.M., Dhadse, S.N., Chaudhari, P.R., Wate, S.R., 2008. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment* 138, 233–238.
- Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees,

- honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 86, 98–104.
- Miller-Ihli, N.J., 1994. Graphite furnace atomic absorption method for the determination of lead in sugars and syrups. *Journal of AOAC International* 77 (5), 1288–1292.
- Miller-Ihli, N.J., Greene, F.E., 1993. Direct determination of lead in sugars using graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Atomic Spectroscopy* 4, 85–89.
- Morgano, M.A., Teixeira Martins, M.C., Rabonato, L.C., Milani, R.F., Yotsuyanagi, K., Rodriguez-Amaya, B., 2010. Inorganic contaminants in bee pollen from Southeastern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6876–6883.
- Needleman, H.L., Bellinger, D., 1991. The health effects of low level exposure to lead. *Annual Review of Public Health* 12, 111–1401.
- Pain, D.J., Carter, I., Sainsbury, A.W., Shore, R.F., Eden, P., Taggart, M.A., Konstantinos, S., Walker, L.A., Meharg, A.A., Raab, A., 2007. Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Science of the Total Environment* 376, 116–127.
- Perugini, M., Di Serafino, G., Giacomelli, A., Medrzyck, P., Sabatini, A.G., Persano Oddo, L., Marinelli, E., Amorena, M., 2009. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 57, 7440–7444.
- Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M.C., Tarasco, R., Amorena, M., 2011. Heavy metals (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research* 140, 170–176.
- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E., Celli, G., 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta* 38, 63–70.
- R Development Core Team, 2010. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Roman, A., 2009. Concentration of chosen trace elements of toxic properties in bee pollen loads. *Polish Journal of Environmental Studies* 18, 265–272.
- Steffan-Dewenter, I., Kuhn, A., 2002. Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270, 569–575.

- Telišman, S., Čolak, B., Pizent, A., Jurasović, J., Cvitković, P., 2007. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environmental Research* 105, 256–266.
- Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M., 2007. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chemistry* 103, 325–330.
- van der Steen, J.J.M., de Kraker, J., Grotenhuis, T., 2011. Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Monitoring and Assessment*. Published online 09 August 2011.
- Vinas, P., Lopez-Garcia, I., Lanzon, M., Hernandez-Cordoba, M., 1997. Direct determination of lead, cadmium, zinc and copper in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry using hydrogen peroxide as a matrix modifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3952–3956.
- Vinas, P., Pardo-Martinez, M., Hernandez-Cordoba, M., 2000. Rapid determination of selenium, lead, and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. *Analytica Chimica Acta* 412, 121–130.
- Yarsan, E., Karacal, F., Ibrahim, I.G., Dikmen, B., Koksal, A., Das, Y.K., 2007. Contents of some metals in honeys from different regions in Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 255–258.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 368, 456–464.

3.3. Données bibliographiques de la contamination des matrices apicoles par le plomb et par d'autres métaux (Cd, Zn ,Cu, Fe et Hg)

3.3.1. Dans la matrice miel

Le miel est un composé naturel complexe produit par les abeilles à partir du nectar ou du miellat. Nourriture de base pour les abeilles, il est largement utilisé par l'Homme comme édulcorant ou pour ses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. Si le miel est réputé pour ses vertus, notamment liées à sa composition (sucres, enzymes, vitamines, hormones, métaux), il peut également contenir de nombreux polluants environnementaux (pesticides, antibiotiques, métaux lourds, ...). A ce titre, le miel est la matrice apicole la plus étudiée quant à la contamination par les métaux.

Les concentrations en plomb retrouvées dans le miel des dix-huit ruchers étudiés sont comprises entre 0,004 et 0,378 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour une moyenne de 0,047 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Lambert *et al.*, 2012a) (Tableau 8). Ces teneurs en plomb sont comparables à celles retrouvées par Przybyłowski et Wilczyńska (2001), Fredes et Montenegro (2006), Tuzen *et al.* (2007), Pisani *et al.* (2008), Achudume et Nwafor (2010) et Bilandžić *et al.* (2011) (Tableau 9). Ces teneurs sont toutefois bien inférieures à celles retrouvées par Otto et Jekat (1977), Kerkvliet (1983), Rowarth (1990), Leblebici et Aksoy (2008), Tudoreanu *et al.* (2008), Codreanu *et al.* (2009a) et Roman *et al.* (2011) (Tableau 9). Quelles que soient les concentrations, la majorité des études fait le lien entre, d'une part, le degré d'anthropisation et les sources potentielles d'émission de plomb (zones industrialisées ou proximité avec des axes routiers), et, d'autre part, les concentrations les plus élevées. Les concentrations les plus élevées en plomb, ont par ailleurs été mesurées pour la plupart lors d'études antérieures à la fin des années 90, c'est-à-dire avant les principales interdictions d'utilisation du plomb prises dans différents pays. Les études récentes pour lesquelles les concentrations mesurées restent élevées correspondent à des études menées sur des échantillons de miel prélevés dans des zones très industrialisées ou peuplées, ou des pays d'industrialisation ancienne (Leblebici et Aksoy, 2008 ; Tudoreanu *et al.*, 2008 ; Roman *et al.*, 2011).

Tableau 8. Concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$) en plomb dans les échantillons de miel pour chaque rucher au cours des deux années d'échantillonnage (périodes 1 et 5 : fin avril-début mai 2008 et 2009 ; périodes 2 et 6 : fin juin-début juillet 2008 et 2009 ; périodes 3 et 7 : fin juillet-début août 2008 et 2009 ; périodes 4 et 8 : fin septembre-début octobre 2008 et 2009). ND : non dosé. Limite de détection = $0,007 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche ; limite de quantification = $0,020 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche.

Rucher	Période d'échantillonnage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,004	0,01	0,004	0,055	0,059	0,115	0,061	0,378
B	0,01	0,004	0,004	0,004	0,032	0,069	0,01	0,004
C	0,004	0,023	0,004	0,021	0,032	0,069	0,01	0,023
D	0,04	0,004	0,004	0,034	0,113	0,086	0,01	0,004
E	0,004	0,004	0,004	0,021	0,032	0,072	0,045	ND
F	0,01	0,004	0,032	0,157	0,073	0,212	0,073	0,03
G	0,004	0,004	0,004	0,004	0,079	0,072	0,01	ND
H	0,004	0,004	0,004	0,004	0,19	0,072	0,058	ND
I	0,004	0,004	0,004	0,004	0,067	0,072	0,116	0,024
J	0,004	0,004	0,004	0,004	0,189	0,048	0,072	0,026
K	0,004	0,004	0,01	0,004	0,031	0,048	0,058	0,045
L	0,004	0,004	0,004	0,004	0,067	0,062	0,116	ND
M	0,264	0,01	0,027	0,138	0,091	0,076	0,072	0,025
N	0,057	0,004	0,027	0,122	0,067	0,048	0,004	0,08
O	0,182	0,024	0,041	0,13	0,069	0,076	0,01	0,025
P	0,152	0,02	0,01	0,122	0,069	0,031	0,004	0,02
IO	0,087	0,069	0,01	0,106	0,01	0,031	0,004	ND
IY	0,038	0,024	0,027	0,131	0,069	0,031	0,01	0,02

Tableau 9. Concentrations en plomb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) déterminées dans des échantillons de miel dans différentes études à travers le Monde

Auteurs (année)	Pays d'étude	Concentrations en plomb dans les miels ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		
		minimum	maximum	moyenne
Otto et Jekat (1977)	Allemagne	24,0	1667,0	149,0
Kerkvliet (1983)	Pays Bas	140,0	1200,0	-
Rowarth (1990)	Nouvelle Zélande	-	1131,0	133,0
Przybyłowski et Wilczyńska (2001)	Pologne	25,0	70,0	48,0
Fredes et Montenegro (2006)	Chili	10,0	110,0	-
Tuzen <i>et al.</i> (2007)	Turquie	8,4	105,8	-
Leblebici et Aksoy (2008)	Anatolie Centrale	200,0	1506,2	-
Pisani <i>et al.</i> (2008)	Italie	28,2	304,0	76,4
Tudoreanu <i>et al.</i> (2008)	Roumanie	-	-	842,0
Codreanu <i>et al.</i> (2009a)	Roumanie	210,0	890,0	-
Achudume et Nwafor (2010)	Nigeria	40,0	230,0	-
Bilandžić <i>et al.</i> (2011)	Croatie	10,0	841,0	65,2
Roman <i>et al.</i> (2011)	Pologne	170,0	1900,0	980,0

Les métaux qui entrent dans les processus biologiques et physiologiques des organismes vivants, tels que le cuivre, le zinc ou le fer, sont systématiquement retrouvés à des concentrations bien plus élevées (de l'ordre de 1000 fois supérieures) dans le miel que les métaux lourds toxiques comme le plomb, le mercure ou le cadmium. Ainsi, de nombreuses études ont montré que les principaux métaux retrouvés sont dans un ordre décroissant : Fe > Zn > Cu > Pb > Hg > Cd (Tableau 10).

En fait, chaque étude met clairement en évidence que les différences de concentrations en métaux dans les miels sont liées à la localisation géographique des ruchers prélevés que ce soit à des échelles régionale (Bilandžić *et al.*, 2011), nationale (Sodré *et al.*, 2007 ; Frias *et al.*, 2008) ou internationale (Bibi *et al.*, 2008).

Tableau 10. Concentrations moyennes en fer (Fe), zinc (Zn), cuivre (Cu), plomb (Pb), mercure (Hg) et cadmium (Cd) déterminées dans des échantillons de miel dans différentes études à travers le Monde.

Auteurs année	Pays	Concentrations dans les miels					
		(µg.g ⁻¹)					(µg.kg ⁻¹)
		Fe	Zn	Cu	Pb	Hg	Cd
Rashed et Soltan (2004) ^{*,a}	Egypte	58,0-202,0	5,0-9,3	1,0-1,75	4200-6300	-	10-500
Fredes et Montenegro (2006) ^b	Chili	0,10-6,36	0,01-4,73	0,06-2,00	10-110	-	10-50
Tuzen <i>et al.</i> (2007) ^b	Turquie	1,8-10,2	1,1-12,7	0,23-2,41	8,4-105,8	-	0,9-17,9
Bibi <i>et al.</i> (2008) ^b	≠ pays	4,345-7,733	0,137-0,472	0,023-0,498	20-1810	-	-
Frias <i>et al.</i> (2008) ^a	Espagne	3,37	2,83	1,28	37,33	-	4,38
Leblebici et Aksoy (2008) ^a	Turquie	0,57-8,74	0,15-5,39	0,01-0,80	20-1500	-	90-240
Achudume et Nwafor (2010) ^a	Nigeria	19,4-43,2	0,06-0,22	21,56-32,73	40-230	-	-
Bilandžić <i>et al.</i> (2011) ^c	Croatie	-	-	1,07	65,2	2,72	1,51

*matière sèche

^a concentrations moyennes comprises entre valeur x – valeur y

^b concentrations comprises entre valeur x – valeur y

^c concentrations moyennes

En résumé, la majorité des études récentes montre des contaminations du miel par les métaux du même ordre de grandeur, les variabilités étant essentiellement liées à l'origine florale du miel, à la période de prélèvement et à la distance des ruchers échantillonnés notamment par rapport aux zones urbanisées et anthropisées, c'est-à-dire aux zones sources de la pollution par les métaux. Les concentrations en métaux dans les miels sont ainsi généralement corrélées au degré de contamination de l'environnement par les métaux. Plusieurs auteurs ont même montré que la contamination des miels par certains métaux pouvait résulter du contact avec les containers lors de leur stockage ou de leur transport (Fredes et Montenegro, 2006 ; Sodré *et al.*, 2007).

3.3.2. Dans la matrice abeilles

Les concentrations en plomb retrouvées dans les abeilles des dix-huit ruchers étudiés sont comprises entre 0,001 et 1,869 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour une moyenne de 0,223 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Lambert *et al.*, 2012a) (Tableau 11).

Tableau 11. Concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en plomb dans les échantillons d'abeilles pour chaque rucher au cours des deux années d'échantillonnage (périodes 1 et 5 : fin avril-début mai 2008 et 2009 ; périodes 2 et 6 : fin juin-début juillet 2008 et 2009 ; périodes 3 et 7 : fin juillet-début août 2008 et 2009 ; périodes 4 et 8 : fin septembre-début octobre 2008 et 2009). ND : non dosé. Limite de détection = 0,007 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche ; limite de quantification = 0,020 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche.

Rucher	Période d'échantillonnage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,306	0,380	0,392	0,224	ND	0,125	0,132	0,107
B	0,173	0,245	0,235	0,225	0,207	0,286	0,238	0,071
C	0,001	0,313	0,290	0,126	0,274	0,100	0,107	ND
D	0,001	0,302	0,190	0,182	0,295	0,019	0,221	0,143
E	0,234	0,245	ND	0,197	0,207	0,137	0,156	ND
F	0,161	0,211	0,291	0,126	0,241	0,015	0,107	0,106
G	0,222	0,245	0,257	0,291	0,296	0,113	0,173	0,108
H	0,113	0,481	0,302	0,197	ND	0,148	0,107	0,091
I	0,368	0,391	0,188	0,498	0,126	0,294	0,124	0,191
J	0,083	0,427	0,075	0,306	0,199	0,197	0,055	0,109
K	0,051	0,828	0,204	0,345	0,023	0,369	0,391	0,182
L	0,003	0,211	0,108	0,212	0,013	0,146	0,125	0,091
M	0,001	0,212	0,140	0,275	0,207	0,090	ND	0,127
N	0,162	0,498	0,301	1,081	0,163	0,160	0,223	0,230
O	0,114	0,241	0,043	0,335	0,351	0,174	0,097	0,122
P	0,004	0,225	0,402	1,869	ND	0,091	0,209	0,108
IO	0,004	0,226	0,239	1,175	ND	0,085	0,125	0,090
IY	0,124	0,358	0,267	0,187	0,224	0,202	0,125	0,200

Ces teneurs en plomb dans les abeilles sont comparables à celles retrouvées par Fakhimzadeh et Lodenius (2000), Conti et Botrè (2001), Porrini *et al.* (2002), Roman (2005), Perugini *et al.* (2011) et van der Steen *et al.* (2011) (Tableau 12). Ces concentrations que nous

avons déterminées sont toutefois inférieures à celles retrouvées par [Pratt et Sikorski \(1982\)](#), [Veleminsky *et al.* \(1990\)](#), [Leita *et al.* \(1996\)](#) et [Roman \(2010\)](#) (Tableau 12).

Tableau 12. Concentrations en plomb ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) déterminées dans des échantillons d'abeilles dans différentes études à travers le Monde.

Auteurs (année)	Pays d'étude	Concentrations en plomb dans les abeilles ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
		minimum	maximum
Pratt et Sikorski (1982)	Etats Unis	1,4	28,1
Veleminsky <i>et al.</i> (1990)	République Tchèque	0,58	9,28
Leita <i>et al.</i> (1996)	Italie	1,4	3,0
Fakhimzadeh et Lodenius (2000)	Finlande	0,27	1,40
Conti et Botrè (2001)	Italie	0,52	1,25
Porrini <i>et al.</i> (2002)	Italie	0,15	0,95
Roman (2005)	Pologne	0,28	1,01
Roman (2010)	Pologne	1,08	3,11
Perugini <i>et al.</i> (2011)	Italie	0,14	1,34
van der Steen <i>et al.</i> (2011)	Pays Bas	0,19	1,67

Les études les plus anciennes montrent les concentrations les plus élevées en plomb dans les abeilles et correspondent à des années où le plomb était encore largement utilisé. Les teneurs les plus élevées retrouvées dans les études récentes sont en lien direct avec des échantillons prélevés dans des zones polluées anthropisées (sites industrialisés, axes routiers et trafic important).

Lors des études précédemment citées, d'autres métaux ont généralement été dosés. Ces études montrent que les concentrations en métaux dans les abeilles sont décroissantes dans l'ordre suivant, $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$; la même distribution est retrouvée dans la matrice miel (Tableau 13).

Tableau 13. Concentrations en fer (Fe), zinc (Zn), cuivre (Cu), plomb (Pb), mercure (Hg) et cadmium (Cd) déterminées dans des échantillons d'abeilles dans différentes études à travers le Monde.

Auteurs année	Pays	Concentrations dans les abeilles ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			
		Zn	Cu	Pb	Cd
Veleminsky <i>et al.</i> (1990)	République Tchèque	90,34-204,4	15,16-37,68	0,58-9,28	0,16-1,75
Leita <i>et al.</i> (1996)	Italie	52,5-76,2	-	1,4-3,0	1,1-1,9
Fakhimzadeh et Lodenius (2000)	Finlande	55,0-100,0	13,0-27,0	0,27-1,40	0,03-1,2
Roman (2010)	Pologne	-	19,5-25,5	1,08-3,11	0,39-1,04
van der Steen <i>et al.</i> (2011)	Pays Bas	61,14-100,64	11,65-19,77	0,19-1,67	0,05-0,75

Les concentrations en métaux (Pb, Cd, Zn, Cu) dans la matrice abeille sont très supérieures à celles retrouvées dans la matrice miel avec un rapport de 100 pour 1 pour le Zn et le Cu, et de 1000 pour 1 pour le Pb et le Cd. Les concentrations suivent la même distribution dans les abeilles que dans le miel avec des concentrations plus élevées en Zn, Cu, Pb puis Cd. Enfin, les abeilles prélevées dans des ruchers proches de zones industrialisées ou de zones à forte circulation automobile présentent une contamination plus importante que celles prélevées dans des zones moins polluées. La matrice abeille est donc une excellente sentinelle de la contamination environnementale par les métaux lourds et s'avère plus sensible que la matrice miel.

3.3.3. Dans la matrice pollen

Les concentrations en plomb retrouvées dans le pollen des dix-huit ruchers étudiés sont comprises entre 0,004 et 0,798 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour une moyenne de 0,240 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ([Lambert *et al.*, 2012a](#)) ([Tableau 14](#)).

Tableau 14. Concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$) en plomb dans les échantillons de pollen pour chaque rucher au cours des deux années d'échantillonnage (périodes 1 et 5 : fin avril-début mai 2008 et 2009 ; périodes 2 et 6 : fin juin-début juillet 2008 et 2009 ; périodes 3 et 7 : fin juillet-début août 2008 et 2009 ; périodes 4 et 8 : fin septembre-début octobre 2008 et 2009). ND : non dosé. Limite de détection = $0,007 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche ; limite de quantification = $0,020 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche.

Rucher	Période d'échantillonnage							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,585	0,004	ND	ND	ND	0,798	0,200	ND
B	0,276	0,004	0,004	ND	0,004	0,392	0,147	0,103
C	0,172	0,004	0,004	ND	0,023	0,427	0,204	ND
D	0,172	0,004	0,004	0,477	0,004	0,494	0,148	0,241
E	0,070	0,004	0,004	0,364	0,004	0,462	0,412	0,156
F	ND	0,004	0,004	0,308	0,004	0,462	0,412	0,156
G	0,070	0,004	0,462	ND	0,062	0,462	0,101	0,147
H	0,103	0,185	0,378	0,392	0,337	0,366	0,153	0,153
I	0,070	0,485	0,490	0,365	0,024	0,779	0,200	0,257
J	0,004	0,185	0,268	0,292	0,272	ND	0,099	ND
K	0,080	0,383	0,240	0,550	ND	ND	0,343	ND
L	0,004	0,151	0,795	ND	0,345	ND	0,010	ND
M	0,080	0,185	ND	ND	0,201	0,262	ND	ND
N	0,048	0,350	0,297	0,740	0,273	0,641	ND	0,202
O	0,218	0,447	0,491	0,357	0,237	0,539	0,099	ND
P	0,105	0,004	0,420	0,389	0,273	0,366	0,145	ND
IO	0,133	0,004	0,336	ND	0,236	0,746	0,098	ND
IY	0,004	0,004	0,363	0,389	0,426	0,262	0,146	0,156

Peu d'études concernent la contamination des pollens par les métaux. Les concentrations que nous avons déterminées, sont comparables à celles retrouvées par [Conti et Botrè \(2001\)](#) et [Morgano *et al.* \(2010\)](#) (Tableau 15). Ces concentrations sont toutefois bien inférieures à celles retrouvées par [Free *et al.* \(1983\)](#), [Roman \(2007\)](#) et [Roman \(2009\)](#) (Tableau 15).

Tableau 15. Concentrations en plomb ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) déterminées dans des échantillons de pollen dans différentes études à travers le Monde.

Auteurs (année)	Pays d'étude	Concentrations en plomb dans les pollens ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
		minimum	maximum
Free <i>et al.</i> (1983)	Angleterre	1,10	3,80
Conti et Botrè (2001)	Italie	0,020	0,329
Roman (2007)	Pologne	0,659	0,910
Roman (2009)	Pologne	0,045 ^a	3,900 ^b
Morgano <i>et al.</i> (2010)	Brésil	0,01	0,44

^a concentration déterminée dans une zone agricole-forestière ; ^b concentration déterminée dans une zone d'essais militaires

Ces études ont par ailleurs montré que les concentrations en Pb étaient supérieures aux concentrations en Cd, elles mêmes supérieures à celles en Hg dans la matrice pollen. Roman (2009) a ainsi déterminé des concentrations comprises entre 0,022 et 1,798 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Cd et entre 0,001 et 0,0427 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Hg. Morgano *et al.* (2010) ont trouvé des concentrations comprises entre 0,001 et 0,233 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Cd et entre 0,0004 et 0,0068 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Hg. Ces concentrations en Pb et en Cd dans le pollen sont du même ordre de grandeur que celles déterminées dans la matrice abeille.

Toutes ces études sur la matrice pollen font une nouvelle fois le lien entre les concentrations les plus élevées en métaux et la proximité avec des sources polluantes (terrains militaires, axes routiers, villes). L'étude de Morgano *et al.* (2010) souligne par ailleurs que la contamination des pollens est plus importante en période de faibles pluies (saison sèche) pour les métaux dispersés par l'air comme le Pb ou le Cd, ce que notre étude confirme (Lambert *et al.*, 2012a).

Dans un même milieu, les niveaux de contamination du pollen en métaux peuvent également varier en fonction de la plante. Ainsi, des pollens de Cassia du Siam (*Cassia siamea*), de Souchet rond (*Cyperus rotundus*) ou de l'Arbre à saucisses (*Kigelia pinnata*), trois espèces communes en Asie, montrent des concentrations différentes en métaux, respectivement de 15,8, 165,1 et 12,7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Fe, 1,7, 78,2 et 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Cu, et 0,6, 11,7 et 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Pb (Kalbande *et al.*, 2008). Cette étude démontre que la contamination des pollens (quelle que soit l'espèce) par les métaux augmente dès lors qu'ils entrent en contact avec l'air. Ainsi alors que le plomb n'est pas détecté dans le pollen d'anthères non éclatées de *Cyperus rotundus* et de *Cassia siamea*, ses concentrations sont respectivement de 11,7 et 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans le pollen de ces deux mêmes espèces végétales qui a


été en contact avec l'air lors de la pollinisation. La contamination du pollen par des polluants atmosphériques, comme les métaux, serait donc liée à la phase aérienne de dissémination du pollen (par le vent ou par les pollinisateurs).

3.4. Conclusion concernant la contamination des matrices apicoles par le plomb

Le dosage du plomb dans les trois matrices apicoles étudiées a montré que l'ensemble des échantillons est contaminé par le plomb quels que soient la matrice, le rucher ou la période de prélèvement. Les concentrations déterminées sont bien plus faibles que celles déterminées lors d'études antérieures au milieu des années 90, années marquées par de nombreuses restrictions d'utilisation du plomb. L'ensemble des données récoltées, tant dans la bibliographie que dans notre travail, montre le lien fort entre la contamination des matrices apicoles et la proximité avec des sources polluantes anthropiques telles que les axes routiers et les zones industrialisées. Il en ressort que les matrices apicoles reflètent le degré de contamination du milieu proche du rucher d'origine et sont donc de bonnes sentinelles de la contamination environnementale par le plomb et les métaux en général. A cette variabilité liée à la localisation du rucher, s'ajoute une variabilité saisonnière, notamment une contamination plus importante lors des périodes sèches.

Les concentrations en plomb dans le miel sont significativement inférieures à celles dans les abeilles ou le pollen, ce fait étant généralisable aux autres métaux (Bogdanov, 2006 ; Eremia *et al.*, 2010). Le miel est donc moins exposé à la contamination par les métaux, cette contamination étant par ailleurs liée à de nombreux facteurs de variabilité naturelle (origine florale, densité florale, ...). Les concentrations en plomb dans le pollen sont comparables à celles dans les abeilles mais l'origine florale et les conditions météorologiques sont des facteurs importants de variation de la contamination du pollen par les métaux. Les conditions météorologiques rendent la récolte de cette matrice aléatoire et, lors de mauvaises conditions pour les abeilles, un certain nombre d'échantillons ne peut être prélevé (Tableau 14). La matrice abeilles semble donc la matrice la plus appropriée pour évaluer la contamination environnementale par le plomb et d'autres métaux : en effet, (i) elle est continuellement exposée aux contaminations atmosphériques lors des vols de butinage ou de récolte d'eau, (ii) son corps recouvert de poils capte les particules en suspension dans l'air, (iii) elle est également exposée par son alimentation. Porrini *et al.* (2002) et Bogdanov (2006) ont été les premiers à souligner cet aspect en concluant que les matrices apicoles telles que le miel ou le

pollen, soumises à de nombreuses variations naturelles, étaient moins appropriées pour servir d'indicateurs de la contamination par les métaux que les abeilles. Des travaux récents (Cozmuta *et al.*, 2012) ont par ailleurs étudié les concentrations et la biodisponibilité du plomb dans le sol ainsi que les concentrations dans différents organes de plantes mellifères et les matrices apicoles. Les résultats confirment notre conclusion et montrent une contamination décroissante des abeilles, des faux-bourçons, de la propolis, des cires, des larves, du miel à la gelée royale.

A photograph of a bee flying towards a purple thistle flower. The background is a soft, out-of-focus green. The text is centered in the lower half of the image.

**CHAPITRE 4 - CONTAMINATION DE TROIS
MATRICES APICOLES PAR LES SUBSTANCES À
USAGES PHYTOSANITAIRES ET VÉTÉRINAIRES**

4.1. Contexte des travaux

Au sens étymologique du terme, les biocides sont des substances actives ou des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, et regroupent les substances phytosanitaires et zoosanitaires destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs des organismes considérés comme nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière (Amiard, 2011). Ils rassemblent les insecticides, les fongicides, les herbicides, les algicides, les rodenticides, les nématocides et les acaricides. D'usage principalement agricole, et qualifiés alors de pesticides, les biocides permettent également de répondre à des besoins d'hygiène publique, de santé publique, de santé vétérinaire, et à des besoins d'entretien sur des surfaces non agricoles (voies ferrées, routes, ...).

Depuis la seconde moitié du XX^e siècle, les pesticides ont largement été incriminés dans la baisse de la biodiversité. Les organochlorés notamment ont été utilisés à très grande échelle et les épisodes nombreux d'intoxication aiguë (Walker *et al.*, 1967 ; Sileo *et al.*, 1977 ; Clark, 1981 ; Ohlendorf *et al.*, 1981 ; Newton *et al.*, 1992 ; Muralidharan, 1993) ont parfois même directement été impliqués dans la diminution importante des populations de certaines espèces (Anderson et Berger, 1968). Par ailleurs, leur rémanence élevée dans le sol et l'eau fait qu'ils ont été, et sont encore de nos jours, l'objet de nombreuses études, leur toxicité chronique étant à l'origine de nombreuses perturbations physiologiques chez nombre d'organismes vivants (Tanabe *et al.*, 1994 ; Grasman *et al.*, 1998 ; Glennemeier et Denver, 2001 ; Iwaniuk *et al.*, 2006). Interdits progressivement dès les années 70, ils ont été remplacés par les organophosphorés et les carbamates. En dépit de leur moindre toxicité, de nombreux cas d'intoxications aiguës et chroniques ont été relatés et la faune sauvage vertébrée a de nouveau été largement impactée (Busby *et al.*, 1983 ; Henny *et al.*, 1987 ; Sanchez-Hernandez, 2001 ; Lambert *et al.*, 2005). Du fait de leurs effets toxiques avérés, de nombreux organophosphorés ont été interdits, même si bon nombre d'entre eux sont encore largement utilisés, notamment dans les cultures fruitières. Dans les années 90, la prise en compte des écosystèmes et des équilibres écologiques dans leur intégralité a amené les chercheurs à évaluer l'impact des pesticides sur l'ensemble des chaînes alimentaires, se préoccupant à la fois de la faune des vertébrés mais également de la faune non cible des invertébrés et mettant ainsi en évidence les effets de nombreuses nouvelles molécules sur les insectes en particulier

(Strong, 1992 ; Wardhaugh *et al.*, 2001 ; Desneux *et al.*, 2007). Ces mêmes années, l'arrivée sur le marché des insecticides systémiques enrobant les semences végétales ouvrent de nouveaux espoirs quant à la protection de l'environnement. Leur mode d'application et leur efficacité permettent en effet de réduire de manière significative les quantités normalement utilisées par pulvérisation et de cibler les insectes piqueurs, suceurs ou phytophages. Néanmoins, leur transfert depuis le sol à tous les organes de la plante et leur toxicité à très faible dose font que leur impact est vite relaté chez les organismes non cibles. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence la toxicité aiguë et chronique sublétales de ces molécules (en tête le néonicotinoïde imidaclopride et le phénylpyrazole fipronil) suite aux mortalités massives et aux troubles sans précédent survenus chez les abeilles domestiques, en France en particulier (Charvet *et al.*, 2004 ; Decourtye *et al.*, 2004a ; Decourtye *et al.*, 2004b ; El Hassani *et al.*, 2005). Bien que la toxicité et les effets délétères de ces molécules, et plus généralement de ces familles de pesticides, sur les organismes non cibles soient démontrés (Medina *et al.*, 2004 ; Overmyer *et al.*, 2005), à chaque interdiction de l'une de ces molécules pour une utilisation précise, succède la mise sur le marché d'une ou de plusieurs autres.

A l'heure actuelle, les populations de pollinisateurs sauvages ou domestiques subissent de fortes mortalités à travers le monde (vanEngelsdorps *et al.*, 2009 ; Ellis *et al.*, 2010 ; Neumann et Carreck, 2010 ; Potts *et al.*, 2010a). Si les études récentes suspectent des causes multiples (vanEngelsdorps et Meixner, 2010), la contamination par les polluants environnementaux reste une cause largement mise en avant. Parmi ces polluants environnementaux, les pesticides occupent une place majeure. Alors que certains d'entre eux sont particulièrement pointés du doigt du fait de leur toxicité chronique sublétales importante et font l'objet de nombreuses recherches (Bonmatin, 2002 ; Colin *et al.*, 2004 ; Belzunces *et al.*, 2012 ; Henry *et al.*, 2012 ; Whitehorn *et al.*, 2012), quelques publications récentes montrent une contamination généralisée des matrices apicoles par une diversité conséquente de molécules (Balayiannis et Balayiannis, 2008 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Chauzat *et al.*, 2011). La question des interactions et des synergies entre ces molécules suscite dorénavant l'inquiétude des communautés scientifique, naturaliste et apicole. Cette situation alarmante est pour le moins paradoxale dans la mesure où les pollinisateurs rendent l'un des plus importants services écosystémiques dans les agroécosystèmes. Ce service écosystémique lié à la pollinisation des cultures est en effet estimé à 153 milliards d'euros chaque année (Gallai *et al.*, 2009). Par ailleurs, les abeilles sont considérées à l'heure actuelle comme les principaux acteurs de cette pollinisation et par là même comme le groupe taxonomique à valeur

économique la plus élevée (Klein *et al.*, 2007 ; Kremen *et al.*, 2007). En parallèle à cette pression par les pesticides, les molécules utilisées lors de traitements vétérinaires sont l'objet de controverse et suspectes d'avoir un effet négatif sur les abeilles. En effet, la polémique a grandi dans le Sud de la France en 2009-2010 lorsque des mortalités importantes d'abeilles ont coïncidé avec les vaccinations massives d'animaux de production et les désinsectisations de locaux dans le cadre de la lutte contre la fièvre catarrhale ovine (Roy, 2010). Le doute est d'autant plus important que les effets délétères des molécules utilisées (pyréthrinoides : deltaméthrine et perméthrine) sont bien documentés chez l'abeille (Vandame *et al.*, 1995 ; Vandame et Belzunces, 1998 ; Decourtye *et al.*, 2004b ; Ramirez-Romero *et al.*, 2005). En plus de cette contamination extrinsèque, les molécules vétérinaires utilisées par les apiculteurs au sein même des colonies dans la lutte contre *Varroa destructor* sont largement retrouvées dans les matrices apicoles (Mullin *et al.*, 2010 ; Orantes-Bermejo *et al.*, 2010), ces molécules, comme le coumaphos, ayant des effets négatifs avérés sur l'abeille (Haarmann *et al.*, 2002 ; Collins *et al.*, 2004 ; Pettis *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette partie est 1/ d'évaluer la contamination des abeilles, du miel et du pollen de trappe par les substances à usages phytosanitaires et vétérinaires au sein des dix-huit ruchers de l'étude, 2/ de la comparer en fonction des différents paysages concernés, 3/ de déterminer son évolution en fonction de la période d'échantillonnage et 4/ de discuter du choix de la meilleure sentinelle apicole pour évaluer ces contaminations extrinsèque et intrinsèque. Ce travail a été l'occasion de la mise au point d'une technique analytique de détection et de quantification d'un maximum de molécules à des limites de détection de l'ordre du ppb. Enfin, les molécules retrouvées dans les matrices apicoles seront comparées aux molécules utilisées sur le terrain au sein de chaque aire de butinage et recensées pour l'année 2008 lors d'une enquête auprès des utilisateurs du paysage (particuliers, professionnels agricoles et apicoles, services d'entretien des espaces verts municipaux ou privés).

4.2. Analyse multi-résidus de 80 contaminants environnementaux dans les miels, les abeilles et les pollens par une procédure d'extraction suivie par de la chromatographie liquide et gazeuse couplée à de la détection par spectrométrie de masse

La majorité des études sur les résidus retrouvés dans les matrices apicoles concernent les produits utilisés par les apiculteurs eux-mêmes alors que peu d'entre elles font référence aux molécules utilisées dans l'environnement global des ruchers en dehors des composés d'actualité tels que l'imidaclopride, le thiaméthoxame ou le fipronil. De plus, les études relatives aux pesticides se limitent généralement à des listes restreintes de matières actives. L'objectif de ce travail a été de mettre au point une méthode fiable et reproductible afin d'identifier et de quantifier un maximum (à des teneurs basses de l'ordre du ppb) de matières actives utilisées dans l'environnement, rapportées par l'abeille et pouvant se retrouver sur elle-même ou dans les matrices apicoles associées. Cette mise au point analytique a reposé sur les échantillons récoltés dans le cadre de notre étude. Les résultats toxicologiques bruts sont donnés en [Annexe 2](#) pour chaque rucher, par matrice et par période d'échantillonnage.

Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans la revue **Journal of Chromatography A** **1218**, 5743-5756 ([Wiest et al., 2011](#)).

Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection

Laure Wiest^{a,*}, Audrey Buleté^a, Barbara Giroud^a, Cédric Fratta^a, Sophie Amic^a, Olivier Lambert^b, Hervé Pouliquen^b, Carine Arnaudguilhem^a

^a*Service Central d'Analyse (SCA), CNRS, Department of Institut des Sciences Analytiques (ISA) - UMR 5280
Chemin du Canal, 69360 Solaize, France*

^b*Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique ONIRIS, Centre
Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes de la Plateforme Environnementale Vétérinaire des Pays de
la Loire - la Chantrerie - BP 40706, 44307 Nantes Cedex 3, France*

*Corresponding author. Tel.: +33 478022277; fax: +33 478027187. E-mail address: l.wiest@sca.cnrs.fr (L. Wiest).

Résumé

Un des facteurs impliqué dans les pertes actuelles de colonies d'abeilles mellifères est la présence croissante de produits chimiques dans l'environnement. L'objectif de cette étude est d'obtenir une vue d'ensemble de la présence de contaminants environnementaux dans des ruchers, et de développer un outil rapide, bon marché et sensible pour doser ces contaminants environnementaux dans les matrices apicoles. Une analyse multi-résidus a été développée pour quantifier 80 contaminants environnementaux, pesticides et médicaments vétérinaires, appartenant à différentes classes chimiques, dans les miels, les abeilles et les pollens. Cet outil consiste en une extraction simple, basée sur une « méthode QuEChERS » modifiée, suivie par de la chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse par temps de vol (GC-ToF) et de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La « méthode QuEChERS » consiste en une extraction/partition liquide-liquide avec de l'acétonitrile et un nettoyage par extraction en phase solide (SPE) dispersée. Elle a été ajustée pour le miel et spécialement pour les abeilles et le pollen, en ajoutant une petite quantité d'hexane dans l'acétonitrile pour éliminer les lipides qui interfèrent avec l'analyse par spectrométrie de masse. Cette méthode combinée à une détection précise et sensible, a permis la quantification et la confirmation de teneurs aussi faibles que 10 ng/g avec des taux de récupérations entre 60 et 120 %. L'application sur plus de 100 échantillons pour chaque matrice a permis d'obtenir une vision globale de la présence de pesticides dans l'environnement des abeilles. Des pourcentages relativement importants de miels, d'abeilles et de pollens sont contaminés par des pesticides utilisés dans la lutte contre *Varroa* mais également par des fongicides comme le carbendazime et des contaminants ubiquistes.

Abstract

One of the factors that may explain nowadays honeybees' colonies losses is the increasing presence of chemicals in the environment. The aim of this study is to obtain a global view of the presence of environmental contaminants in beehives and, develop a fast, cheap and sensitive tool to analyze environmental contaminants in apiarian matrices. A multi residue analysis was developed to quantify 80 environmental contaminants, pesticides and veterinary drugs, belonging to different chemical classes, in honeys, honeybees and pollens. It consists in a single extraction, based on a modified "QuEChERS method", followed by gas chromatography coupled with Time of Flight mass spectrometry (GC-ToF) and liquid

chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). The “QuEChERS method” combines salting-out liquid-liquid extraction with acetonitrile and a dispersive-SPE clean up. It was adjusted to honey and especially to honeybee and pollen, by adding a small fraction of hexane in acetonitrile to eliminate lipids that interfere with mass spectrometry analysis. This method, combined with accurate and sensitive detection, allowed quantification and confirmation at levels as low as 10 ng/g, with recoveries between 60 and 120%. Application to more than 100 samples of each matrix was achieved for a global view of pesticide presence in the honeybee environment. Relatively high percentages of honeys, honeybees and pollens were found to be contaminated by pesticides used to combat varroa but also by fungicides like carbendazim and ubiquitous contaminants.

1. Introduction

Nowadays, it is well-known that bee mortality has never been so high all over the world. One of the hypotheses to explain this mortality is the increasing use of pesticides. To check this hypothesis, a global view of beehives contamination is needed and ecotoxicological studies on honeybees have to be conducted, which requires reliable and sensitive analytical methods. Furthermore, honeybees are subject to a large range of molecules, including pesticides and also antibacterial substances that can be used by farmers [1]. Consequently, to survey beehives contamination, fast and cheap multi-residue analytical methods have to be developed.

The most universal extraction method to analyze a wide range of pesticides is the “QuEChERS method”. This method consists in two steps, liquid-liquid extraction, and purification by dispersive Solid Phase Extraction (dSPE). QuEChERS stands for quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe. This method was first introduced by Anastassiades et al. [2] in 2003. The original method was developed in order to extract pesticides from fruits and vegetables. Initially, it consisted in salting-out liquid–liquid extraction, using acetonitrile, MgSO₄ and NaCl salts and a dispersive SPE step based on primary and secondary amine bonded silica (PSA). One of the QuEChERS method advantages is to be a simple method, easily adjustable. Consequently, since 2003, the two steps of this method have been optimized and adjusted several times. In 2005, Lehotay et al. [3] added acetate salts in order to buffer the liquid–liquid extraction and avoid the degradation of base-sensitive pesticides. In 2008, Przybylski et al. [4] published a QuEChERS method adjusted for high fat matrices, adding a

small fraction of hexane in acetonitrile, to remove lipids from the extract. Regarding the second step, in 2006, Leandro et al. [5] used PSA and octadecyl bonded silica (PSA/C18) instead of PSA bonded silica to eliminate apolar interferences of the matrix. In 2010, Mullin et al. [6] adapted successfully this method to wax, pollen, bees and beebread, coupled with analysis by LC–MS/MS and GC–MS/MS: the usual 15 g sample was reduced to 3 g and for GC analysis the final extract was further purified by SPE, using a dual layer cartridge which contains PSA and graphitized carbon black (GCB). Finally, Barakat et al. [7] published an analytical method of honey which contained a supplementary concentration step in order to reduce method limits of detection. Wilkowska et al. recently published a review about the numerous applications of the QuEChERS method on food matrices [8].

Regarding analytical techniques, GC–EI–MS and LC–ESI–MS/MS are the most used techniques for multi-residue analysis of pesticides in food [9,10] and bee products [1,11] but they are both subject to strong matrix effects which can significantly reduce or enhance the analyte response and lead to wrong quantification. Consequently, solutions have to be found to reduce them and to take them into account for quantification. Most of them have been reviewed in 2003 by Hajslová et al. [12]. Regarding matrix effects in pesticide analysis by GC, an innovative solution was published by Anastassiades et al. [13] which consist in adding compounds called “analyte protectants” (AP) that interact more than pesticides with active sites present in the chromatographic system. There is no equivalent considering LC analysis but, according to Gros et al. [14], the dilution of sample extracts is an efficient strategy to reduce ion suppression.

In light of these concerns, the aim of this study was to develop a simple, fast, sensitive and reliable analytical method for trace analysis of a large number of environmental contaminants in beehives matrices. A list of 80 compounds (Table 1) covering more than 14 families of contaminants were chosen on geographical, economical and scientific (persistence in the environment, bioaccumulation) criteria [15]. This list contains a majority of pesticides but also veterinary drugs and a synergist. Physicochemical properties of these compounds are so different that two separation techniques were necessary: gas and liquid chromatography [16]. Consequently, the extraction method chosen had to be compatible with GC and LC, which is one of the characteristics of the QuEChERS method. Regarding honey, the protocol applied in this study was based on the one published by Barakat et al. [7], who added a concentration step in order to reach limits of detection in the range of environmental concentration. The main difference was that the buffer used in our work was citrate instead of acetate, according to the Standard Method EN 15662 [17].

Table 1

Compounds studied in this work and their chemical class; OH, organohalogen; OPP, organophosphorous; Pyr, pyrethroid; IGR, insect growth regulator; Syn, synergist.

Compound	Class	Compound	Class	Compound	Class
Aldrin	<i>OH</i>	Cadusaphos	<i>OPP</i>	Bitertanol	<i>Triazole</i>
Bromopropylate	<i>OH</i>	Chlorpyriphos	<i>OPP</i>	Cyproconazole	<i>Triazole</i>
Chlorothalonil	<i>OH</i>	Chlorpyriphos-	<i>OPP</i>	Flusilazole	<i>Triazole</i>
DDD o,p'	<i>OH</i>	Coumaphos	<i>OPP</i>	Myclobutanil	<i>Triazole</i>
DDT p,p'	<i>OH</i>	Diazinon	<i>OPP</i>	Propiconazole	<i>Triazole</i>
Dicloran	<i>OH</i>	Dichlorvos	<i>OPP</i>	Penconazole	<i>Triazole</i>
Dicofol	<i>OH</i>	Dimethoate	<i>OPP</i>	Tebuconazole	<i>Triazole</i>
Dieldrin	<i>OH</i>	Ethoprofos	<i>OPP</i>	Triadimenol	<i>Triazole</i>
Endosulfan alpha	<i>OH</i>	Fenitrothion	<i>OPP</i>	Paclbutrazide	<i>Triazole</i>
Endosulfan beta	<i>OH</i>	Malathion	<i>OPP</i>	Clothianidin	<i>Nicotinoid</i>
Endosulfan sulphate	<i>OH</i>	Methamidophos	<i>OPP</i>	Imidacloprid	<i>Nicotinoid</i>
Lindane	<i>OH</i>	Parathion	<i>OPP</i>	Thiamethoxam	<i>Nicotinoid</i>
Hexachlorobenzene	<i>OH</i>	Phenthoate	<i>OPP</i>	Abamectin	<i>Avermectin</i>
Methoxychlor	<i>OH</i>	Phosalone	<i>OPP</i>	Eprinomectin	<i>Avermectin</i>
Tetradifon	<i>OH</i>	Phosmet	<i>OPP</i>	Ivermectin	<i>Avermectin</i>
Benalaxyl	<i>Amide</i>	Phoxim	<i>OPP</i>	Moxidectin	<i>Avermectin</i>
Prochloraz	<i>Amide</i>	Tolclofos-methyl	<i>OPP</i>	Bupirimate	<i>Pyrimidine</i>
Bifenthrin	<i>Pyr</i>	Triphenylphosphate	<i>OPP</i>	Fenarimol	<i>Pyrimidine</i>
Cyfluthrin	<i>Pyr</i>	Carbaryl	<i>Carbamates</i>	Procymidone	<i>Dicarboximid</i>
Cypermethrin	<i>Pyr</i>	Carbendazim	<i>Carbamates</i>	Vinclozolin	<i>Dicarboximid</i>
Deltamethrin	<i>Pyr</i>	Carbofuran	<i>Carbamates</i>	Iprodione	<i>Dicarboximid</i>
Esfenvalerate	<i>Pyr</i>	Diethofencarb	<i>Carbamates</i>	Imazalil	<i>Imidazole</i>
Permethrin	<i>Pyr</i>	Fenoxycarb	<i>Carbamates</i>	Amitraz	<i>Formamidine</i>
Tau-Fluvalinate	<i>Pyr</i>	Methiocarb	<i>Carbamates</i>	Clofentezine	<i>Tetrazine</i>
λ cyhalothrin	<i>Pyr</i>	Methomyl	<i>Carbamates</i>	Hexythiazox	<i>Thiazolidine</i>
Piperonyl Butoxide	<i>Syn</i>	Thiophanate-methyl	<i>Carbamates</i>	Pyriproxifen	<i>IGR</i>
				Buprofezin	<i>IGR</i>

However, the same method could not be applied to honeybees and pollens which contain high amounts of lipids. The addition of hexane at the first step of QuEChERS, as suggested by Przybylski et al. [4] for high fat matrices extraction, was successfully applied. Analytical techniques used in this work are among the most efficient technique available: LC–MS/MS and GC-ToF. LC–MS/MS is well-known for its great sensitivity and as a reliable tool for quantification. Unlike LC–MS/MS, few studies used GC-ToF as a tool for quantification [18–22]. High acquisition rate and greater selectivity compare to simple quadrupole make GC-ToF a powerful instrument for analysis [23]. Furthermore, thanks to new technology like dynamic range enhancement [20], the dynamic range of recent GC-ToF is comparable to GC–MS, which allows accurate quantification, even in very complex matrices such as pollen. Finally,

in this work, special attention was brought to lower matrix effect. Matrix matched calibration was used for quantification and two strategies were tested: dilution of the extract and the use of AP.

In conclusion, this paper presents an original analytical approach which consists in one simple extraction method for each matrix coupled with GC and LC analysis and a comprehensive validation of the whole method. The method developed in this work is expected to be applied as a fast and reliable tool for routine analysis of a large range of compounds at trace level that is in the range of 10–50 ng/g. Application to a large number of samples was made in order to check the robustness of the method but also to obtain a global view of environmental contaminants presence in beehives and to compare the contamination of honeys, honeybees and pollens.

2. Materials and method

2.1. Materials

All compounds were obtained from Sigma–Aldrich with purity higher or equal than 97% (St. Quentin Fallavier, France), except tau-fluvalinate 93.8%, cypermethrine 95.1%, malathion 96.1%, fenitrothion 95.4%, ethoprophos 93.1%, tefluthrin 96.8%, and moxidectin 92.3%. Methiocarb (95%) were obtained from Chemservice, and piperonyl butoxide (92.5%), Cyhalothrin-lambda, hexythiazox, eprinomectin (95.0%), cadusafos, and cypermethrine (92.0%) were obtained from Cluzeau (Ste Foy la Grande, France). Isotopically labeled compounds were carbaryl-d₇ (98.8%), malathion-d₇ (99%) and carbendazim-d₄ (99.2%) chlorpyrifos-methyl-d₆ (98%) obtained from Cluzeau. Stock standard solutions of each compound at 1000 mg/L were prepared in acetonitrile (ACN), acetone or methanol, except carbendazim in dimethylformamide and stored at –18 °C. A mixture of these standards at 10 mg/L, prepared in ACN, stored at –18 °C was stable for at least 6 months.

Three compounds were used as analyte protectants (AP) for GC analysis: 3-ethoxy 1-2 propanediol (98%, Aldrich), d-(+)-gluconic acid δ -lactone (99%, Sigma), shikimic acid (99%, Aldrich). Standard solutions of each compound at 50 mg/mL were prepared in 30/70 water/ACN and stored at 4 °C. A mixture of these standards, called “AP mix”, was prepared in ACN, stored at 4 °C, leading to respective concentrations of 30, 10 and 5 mg/mL for 3-ethoxy 1-2 propanediol, d-(+)-gluconic acid δ -lactone, shikimic acid.

LC–MS ACN and methanol, hexane, ammonium formate, formic acid were obtained from Fluka (Sigma–Aldrich). The water used was purified by a Milli-Q water system (Millipore, France). “Citrate QuEChERS kits” were obtained from Agilent Technologies: salts are packaged separately and consist in 4 g of anhydrous MgSO₄, 1 g of sodium chloride, 1 g of sodium citrate dihydrate and 500 mg of disodium citrate sesquihydrate. Fifteen mL centrifuge tubes of PSA and PSA/C18 dispersive SPE were purchased from Carlo-Erba: PSA tubes contain 900 mg of anhydrous MgSO₄, 150 mg of PSA bonded silica and PSA/C18 tubes, 900 mg of anhydrous MgSO₄, 150 mg of PSA bonded silica and 150 mg of C18 bonded silica.

2.2. Sample collection

Blank matrix samples were constituted by samples collected in Ouessant Island during the summer 2008 (1 kg of honeybees, 1 kg of trap pollen, 1 kg of honey) and were checked for no contamination.

Other samples were collected during the beekeeping seasons 2008 and 2009 (4 samplings per year: April/May, June/July, July/August, September/October). They concerned 16 apiaries of the “Région des Pays de la Loire” (Western France) located in four types of landscapes (bocage, large-scale farming, gardening/orchards, urban area) and two control apiaries (less inhabited landscapes) located in Atlantic islands (Island of Yeu and Island of Ouessant) [15]. For each period, samples were collected in several colonies of every apiary (honey, foraging bees and trap pollen) and repackaged to obtain one pool per apiary. All samples were stored at –20 °C until analysis.

2.3. Sample preparation

The overall sample preparation strategy is represented in [Fig. 1](#).

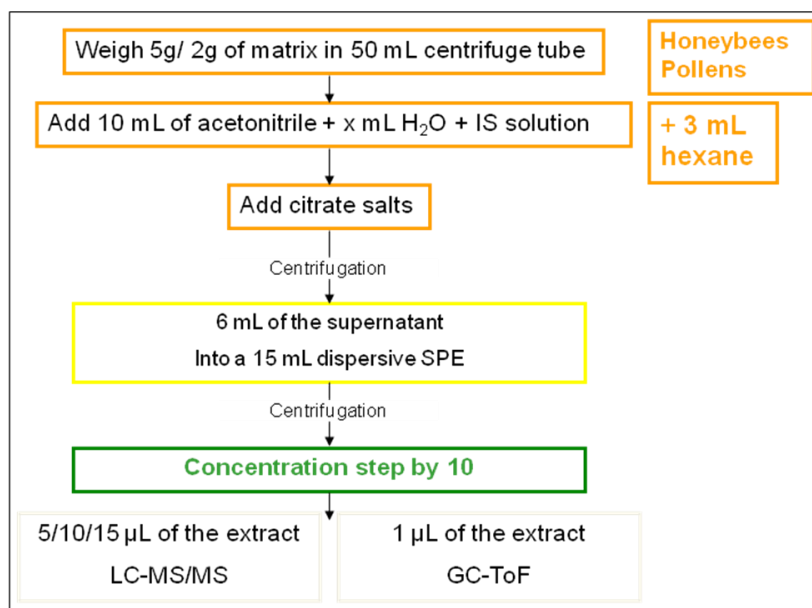


Fig. 1. Sample preparation strategy based on QuEChERS method.

2.3.1. Honey

First, 5 g of honey are weighed in a 50 mL centrifuge tube, 10 mL of water are added. The tube is then shaken to dissolve honey. When the mixture is homogeneous, 10 mL of acetonitrile (ACN), “citrate QuEChERS” salts (described in Section 2.1) and 200 µL of an isotopically labeled compounds working solution (carbaryl-d₇, malathion-d₇ and carbendazime-d₄) at 1 mg/L are added. For calibration point, a suitable volume of a working standard solution at 1 mg/L is also added. Next, the tube is immediately shaken by hand, vortexed one minute and then centrifuged for 2 min at 5000 × g. Afterwards, 6 mL aliquot of supernatant are added in a pre-prepared 15 mL PSA tube (described in Section 2.1). Then, this tube is immediately shaken by hand, vortexed 10 s and centrifuged for 2 min at 5000 × g. Finally, 4 mL of the extract, sampled in a 10 mL glass cone-ended centrifuge tube, are evaporated until 50 µL are left, and the remaining extract is kept at −18 °C until analysis.

2.3.2. Honeybees

First, about 10 g of honeybees is sampled and ground with a Microtron MB 550 (Kinematica, Switzerland). After that, 5 g of honeybees ground are weighed in a 50 mL centrifuge tube, in which 10 mL of ACN, 3 mL of water, 3 mL of hexane and “citrate QuEChERS” salts and 200 µL of an isotopically labeled compounds working solution (carbaryl-d₇, malathion-d₇ and carbendazime-d₄) at 1 mg/L are then added. For calibration point, a suitable volume of a working standard solution at 1 mg/L is also added. Next, the tube is immediately shaken by

hand, vortexed 1 min and then centrifuged for 2 min at $5000 \times g$. Afterwards, 6 mL of the acetonitrile fraction (below the hexane fraction) is added in a pre-prepared 15 mL PSA/C18 tube (described in Section 2.1). Then, this tube is immediately shaken by hand, vortexed 10 s and centrifuged for 2 min at $5000 \times g$. Finally, 4 mL of the extract, sampled in a 10 mL glass cone-ended centrifuge tube, are evaporated until 50 μ L are left, and the remaining extract is kept at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

2.3.3. Pollens

2 g of pollens are weighed in a 50 mL centrifuge tube, in which 10 mL of ACN, 8 mL of water, 3 mL of hexane and “citrate QuEChERS” salts are then added. Next, the sample preparation is the same as for honeybees.

2.3.4. Reconstitution of the extract

Just before analysis, 80 μ L of a chlorpyrifos-methyl- d_6 working solution at 1 mg/L and 270 μ L of ACN are added to obtain a final volume of 400 μ L. An aliquot of 100 μ L is diluted by 10 in 90/10 mobile phase/ACN for honey and honeybees and in 90/10 mobile phase/ACN and 100% ACN (see Section 3.1.2) for pollens, regarding LC–MS/MS analysis. An aliquot of 90 μ L is taken and mixed with 10 μ L of AP mix (see Section 2.1) for GC-ToF analysis.

2.4. LC–MS/MS

The system used was a Waters 2695 series Alliance HPLC (Waters, Milford, MA) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer Quattro from Micromass (Manchester, UK) equipped with a Z-spray electrospray interface (ESI). Data were processed with MassLynx 4.1.

The chromatographic separation was performed on a Nucleodur Sphinx RP-C18 (50 x 2 mm, 1.8 μ m) column from Macherey-Nagel with in-line filter “krudkatcher” 0.5 μ m porosity (Phenomenex). The column oven temperature was set to $40 \text{ }^\circ\text{C}$; the flow rate was 300 μ L/min. Samples were analyzed with the mobile phase (A) water with ammonium formate 0.3 mM and 0.05% formic acid and (B) methanol. Samples were analyzed in positive mode with the following elution program: from 0 to 5 min linear gradient from 98 to 68% (A), from 5 to 8 min, step at 68% (A), from 8 to 13 min, linear gradient to 100% (B), from 13 to 21 min, step

at 100% (B) and 21.1 to 31 min step at 100% (A). Injection volume and solvent depend on the matrix: 15 and 10 μL in 90/10 mobile phase (A)/ACN for honey and honeybees respectively; 5 μL in 90/10 mobile phase (A)/CAN and 100% ACN (see Section 3) for pollens.

Electrospray ionization was performed in the positive mode. The electrospray source parameters were capillary voltage 3.2 kV, the temperatures of the source and desolvation 120 and 350 $^{\circ}\text{C}$, respectively, the nitrogen flow was adjusted to 80 L/h for the cone gas and 550 L/h for the desolvation gas. For each compound, cone voltage and collision energies of two MRM transitions were optimised from a continuous flow of a standard injection (10 mg/l solution in 50/50 (A) and (B) at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) to obtain the maximum intensities. Parent ions and fragment ions selected for confirmation are listed in Table 2. MRM 1 is used for quantification and MRM 2 for confirmation. The analytical run is divided into 10 periods. Interscan and interchannel delays were optimized to 0.03 s.

2.5. GC-ToF

GC-ToF analysis was carried out with a 6890 Agilent gas chromatograph (Agilent Technologies, Avondale, USA) coupled to a Time of Flight (ToF) mass spectrometer GCT Premier from Waters. Data were processed with MassLynx 4.1.

Chromatographic separation was performed on a 30m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness DB-XLB capillary column. Helium (purity 99.999%) was used as a carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. Initial oven temperature was set at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, followed by a linear ramp to 220 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Subsequently, the temperature was raised to 290 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hold 6.4 min, followed by a ramp to 300 at a rate of 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and a hold time of 9.7 min, leading to a total run time of 30 min. A split-splitless injector set at 280 $^{\circ}\text{C}$ was always used and injections were performed in the splitless mode. Injection volume and solvent was 1 μL in 90/10 ACN/AP mix (see Section 2.1). A solvent delay of 4 min was applied. Transfer line temperature was set at 250 $^{\circ}\text{C}$ and the source temperature at 200 $^{\circ}\text{C}$.

The mass spectrometer was operated in the electron impact mode (EI, 70 eV). Multichannel plate voltage was set at 2800 V, acquisition rate at 10 spectra/s (i.e. 5 spectra/s with “Dynamic Range Enhancement” mode on) and pusher interval at 40 μs . Acquisition was performed in the full scan mode with a scan range of m/z 50–550. Calibration was done using the calibration wizard, with heptacosane as the reference. The mass resolution was around 5000

FMWH for m/z 218.9856. During acquisitions, an internal standard, pentafluorochloro benzene, was introduced continuously into the EI source, from a reference reservoir at 50 °C and through a reference inlet at 120 °C. The mass m/z 201.9609 was used as lock mass.

Table 2
LC–MS/MS acquisition method parameters.

Compound	t_R (min)	MRM 1	Cone voltage(V)	CE (eV)	MRM 2	CE (eV)	MRM ratio
Methamidophos	1.70	142> 94	20	15	142 > 125	15	2.6
Amitraze I*	3.32	122> 107	28	15	122 > 77	30	1.6
<i>Carbendazime-d₄</i>	4.73	196 > 164	25	15			
Carbendazime	4.83	192 > 160	18	15	192 > 132	30	4.5
Methomyl	6.47	163 > 88	10	8	163 > 106	10	1.4
Thiamethoxam	7.22	292 > 211	20	15	292 > 181	20	1.6
Clothianidine	7.97	250 > 169	15	13	250 > 132	15	1.4
Imidacloprid	8.40	256 > 175	20	20	256 > 209	15	1.1
Amitraze II*	10.90	150 > 107	20	20	150 > 132	15	2.3
Imazalil	12.40	297 > 159	35	20	297 > 201	20	3.7
Carbofuran	13.04	222 > 165	18	15	222 > 123	20	1.2
Thiophanate-methyl	13.09	343 > 151	18	20	343 > 311	10	5.9
Carbaryl	13.10	202 > 145	12	10	202 > 117	20	6.4
<i>Carbaryl-d₇</i>	13.10	209 > 152	20	20			
Methiocarbe	14.40	226 > 121	15	20	226 > 169	10	1.5
Diethofencarbe	14.40	268 > 226	10	10	268 > 180	15	2.2
Cyproconazole	14.60	292 > 70	15	15	292 > 125	25	4.4
Triadimenol	14.84	296 > 70	12	15	296 > 99	15	9.3
<i>Malathion-d₇</i>	14.85	338 > 128	15	15			
Fenoxycarbe	15.20	302 > 88	20	20	302 > 116	10	1.3
Iprodione	15.27	330 > 245	25	15	330 > 288	10	7.3
Prochloraz	15.40	376 > 308	12	10	376 > 70	20	2.3
Clofentezine	15.60	303 > 138	18	15			
Phoxim	15.57	299 > 129	14	8	299 > 153	8	1.8
Coumaphos	15.56	363 > 227	22	25	363 > 307	20	3.2
Chlorpyrifos-methyl	15.70	322 > 125	22	20	322 > 290	15	1.5
<i>Chlorpyrifos-methyl-d₆</i>	15.70	328 > 131	15	15			
Piperonyl Butoxide	16.00	356 > 119	17	30	356 > 177	15	2.7
Pyriproxyfen	16.03	322 > 96	20	20	322 > 227	15	5.2
Hexythiazox	16.17	353 > 168	22	25	353 > 228	15	1.3
Eprinomectin	16.49	915 > 186	20	20	915 > 330	15	5.6
Abamectin	16.47	891 > 305	10	20	891 > 567	15	0.7
Moxidectin	16.80	640 > 528	15	10	640 > 498	15	4.5
Ivermectin	16.86	893 > 569	20	15	893 > 307	25	1

* Amitraze I=2,4-dimethylphenylamine; Amitraze II=N-(2,4 dimethylphenyl) formamide

2.6. Method validation

2.6.1. Method validation plan

The developed method was validated following mainly the International Conference on Harmonisation (ICH) [24]. The validation strategy is represented in Fig. 2. It was performed on 3 days with concentration ranges between 4 and 60 ng/g regarding honeys and honeybees and between 10 and 150 ng/g considering pollens. More precisely, each day, 6 samples of blank matrix spiked with 6 levels of concentration (C1, C2, C3, C4, C5 and C6) were extracted to determine linearity and Intermediate precision; two more samples of blank matrix spiked with one level (first day C2, second day C4, third day C6) were extracted to determine repeatability (n = 3); Three samples of blank matrix were extracted and spiked just before analysis, at the same level as for repeatability, to determine recoveries. To resume, this validation strategy consists in 11 experiments per day, during 3 days.

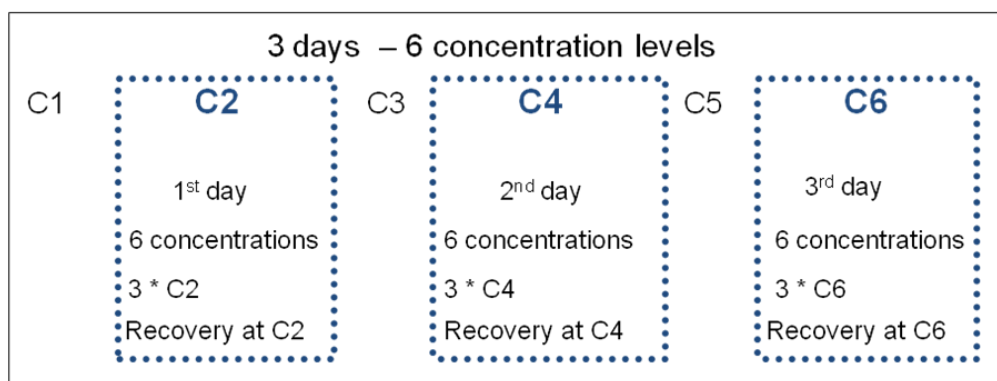


Fig. 2. Validation plan on three days; C1, C2, C3, C4, C5 and C6 corresponds to 4, 10, 20, 30, 40 and 60 ng/g for honeys and honeybees and to 10, 25, 50, 75, 100 and 150 ng/g for pollens.

2.6.2. Method validation parameters

For LC/GC analysis, the method limit of detection (LOD) was determined as the analyte concentration that produced a peak signal of three times the background noise from the chromatogram, regarding MRM 2/confirmation m/z. The method limit of quantification (LOQ) was determined as the analyte concentration that produced a peak signal of ten times the background noise from the chromatogram regarding MRM 1/quantification m/z, and at which the MRM/ion ratio is consistent with the MRM/ion ratio of a standard (Relative Standard Deviation (RSD) < 20%), respectively.

Other validation parameters were determined on the peak areas of the compound in the blank matrix sample spiked before extraction ($A_{\text{extraction}}$) and in the blank matrix sample spiked just before analysis (A_{analysis}). Recovery was expressed as the ratio $A_{\text{extraction}}/A_{\text{analysis}}$ in percentage. Repeatability was expressed as the RSD of $A_{\text{extraction}}$ of samples extracted the same day, at the same concentration. Intermediate precision was expressed as the RSD of $A_{\text{extraction}}$ of samples extracted in different days, at the same concentration. Regarding LC–MS/MS analysis, due to matrix effect, areas were corrected with the area of the isotopically labeled compound carbaryl- d_7 for honeys and honeybees and carbaryl- d_7 and malathion- d_7 for pollens (A_{IsoLab}). Intermediate precision was expressed as the RSD of the ratio $A_{\text{extraction}}/A_{\text{IsoLab}}$.

2.6.3. Quantification

Matrix-matched calibration was used for quantification. In each batch, 6 calibration points prepared as describe in Section 2, with concentration ranges between 4 and 60 ng/g for honeys and honeybees and between 10 and 150 ng/g for pollens, were injected.

Quantification was performed using QuanLynx 4.1. Considering LC–MS/MS analysis, each compound, except clofentezine, was characterized by its retention time, two MRM transitions and the MRM ratio which was obtained by the ratio between the MRM 1 and MRM 2 areas (Table 2). Regarding GC-ToF analysis, each compound was characterized by its retention time and two masses with mass windows between 0.02 and 0.1 Da and the ion ratio (Table 3). The ion ratio was calculated by the ratio between the quantification m/z and confirmation m/z areas. Eight analytes, in bold in Tables 2 and 3, were analyzed both by LC–MS/MS and GC-ToF.

In a batch, each sample was injected twice. Instrumental performance was checked with the signal area of chlorpyriphosmethyl- d_6 present in each sample and the injection of Quality Control samples. Extraction performance was checked following the signal areas of carbaryl- d_7 , malathion- d_7 and carbendazime- d_4 .

Table 3**GC–ToF acquisition method parameters.**

Compound	t_R (min)	Quantification ion m/z	Mass window (Da)	Confirmation ion m/z	Mass window (Da)	Ion ratio
Dichlorvos	4.89	109.007	0.02	184.974	0.03	2.4
Ethoprophos	7.07	157.963	0.02	96.952	0.03	1.7
Cadusafos	7.32	158.972	0.02	157.963	0.03	1.3
Hexachlorobenzene	7.76	283.807	0.02	285.808	0.03	1.2
Dimethoate	7.77	87.016	0.03	93.007	0.03	1.6
Dichloran	7.78	175.993	0.03	177.993	0.05	2.2
Diazinon	7.80	152.096	0.02	304.105	0.03	0.7
Lindane	8.06	218.913	0.03	180.936	0.03	1.0
Vinclozoline	8.57	284.996	0.03	212.003	0.03	2.1
Chlorpyrifos-methyl	8.62	285.926	0.04	287.925	0.03	1.4
<i>Chlorpyrifos-methyl-d₆</i>	8.62	291.963	0.04	293.960	0.03	1.4
Tolclofos-methyl	8.72	264.989	0.02	266.986	0.03	2.6
Chlorothalonil	8.86	265.878	0.03	263.887	0.03	1.4
<i>Malathion-d₇</i>	8.89	174.085	0.02	131.018	0.05	0.7
Malathion	8.93	173.079	0.03	127.037	0.03	1.8
Fenitrothion	9.02	277.017	0.03	260.017	0.03	1.9
Chlorpyrifos	9.16	198.913	0.02	196.920	0.03	0.9
Aldrin	9.25	262.862	0.02	260.855	0.03	1.6
Parathion	9.33	291.042	0.05	109.012	0.03	2.3
4,4'-dichlorobenzophenone	9.60	138.999	0.03	250.018	0.05	43.2
Phenthoate	9.75	273.985	0.06	124.980	0.03	3.6
Penconazole	9.86	248.098	0.02	158.978	0.05	1.3
Procymidone	9.96	283.017	0.03	285.011	0.03	1.7
Triadimenol	9.97	168.115	0.03	112.051	0.03	1.0
Paclobutrazol	10.34	236.059	0.03	125.015	0.03	3.1
Endosulfan I	10.49	236.842	0.03	240.893	0.04	1.1
Bupirimate	10.60	273.097	0.03	193.145	0.05	6.7
Buprofezine	10.65	105.056	0.02	106.066	0.03	2.4
<i>o,p</i> -DDD	10.85	235.007	0.02	237.005	0.03	1.4
Flusilazole	10.88	233.060	0.02	206.053	0.04	3.3
Dieldrin	10.88	262.859	0.03	264.861	0.03	1.7
Myclobutanil	10.99	179.032	0.04	150.010	0.03	2.7
Cyproconazole	11.29	222.043	0.03	138.999	0.05	2.4
Endosulfan II	11.69	236.842	0.03	240.906	0.05	0.7
Benalaxyl	11.70	148.112	0.02	206.117	0.03	4.4
Propiconazole	12.03	259.033	0.02	172.954	0.03	1.0
Propargite	12.04	135.081	0.04	173.094	0.05	1.7
<i>p,p</i> -DDT	12.05	235.008	0.05	237.001	0.03	1.7
Piperonyl Butoxide	12.09	176.083	0.03	177.087	0.05	3.2
Triphenylphosphate	12.14	326.070	0.03	325.057	0.05	1.2
Endosulfan sulphate	12.37	271.822	0.04	273.808	0.03	1.2
Tebuconazole	12.39	125.013	0.05	250.077	0.1	0.5
Bifenthrin	12.47	181.104	0.02	166.076	0.03	9.1
Bromopropylate	12.73	340.902	0.03	338.905	0.03	2.0

Compound	t_R (min)	Quantification ion m/z	Mass window (Da)	Confirmation ion m/z	Mass window (Da)	Ion ratio
Methoxychlor	12.85	227.106	0.02	228.112	0.03	3.7
Phosmet	13.02	160.041	0.03	161.041	0.05	12.3
Pyriproxyfen	13.42	136.076	0.03	226.098	0.03	9.7
Cyhalothrin-lambda	13.49	181.066	0.02	197.036	0.05	1.6
Tetradifon	13.50	158.970	0.03	228.889	0.03	1.2
Phosalone	13.67	182.004	0.05	184.000	0.05	4.1
Fenarimol	14.11	138.992	0.02	219.037	0.03	1.0
Bitertanol	14.53	170.073	0.02	168.113	0.05	8.3
Permethrin	14.50	183.079	0.05	184.089	0.05	7.1
Coumaphos	15.05	362.019	0.05	225.986	0.03	2.4
Cyfluthrin	15.23	206.055	0.05	227.076	0.03	1.5
Cypermethrin	15.54	163.008	0.07	165.008	0.03	2.0
<i>tau</i> -Fluvalinate	17.19	250.060	0.05	252.060	0.03	10.9
Esfenvalerate	17.54	125.013	0.05	225.079	0.1	1.7
Deltamethrin	18.66	252.917	0.05	181.067	0.05	0.9

3. Results and discussion

3.1. Method optimization

3.1.1. Sample extraction

Regarding the extraction methodology, our main criterion was to find one that gives acceptable recoveries for all analytes with only one protocol. In preliminary studies, based on previous work and literature, three methodologies were tested: solid phase extraction (SPE) for honeys [25], matrix solid phase extraction (MSPD) for pollens and honeybees [26], and the QuEChERS method [7,27], based on the Standard Method EN 15662 [17]. Regarding SPE, depending on the type of phase used, poor recoveries were obtained either for the most polar compounds such as methamidophos, or the most apolar ones such as hexachlorobenzene. The use of MSPD led to poor recoveries regarding the most polar compounds. Finally, the QuEChERS method was the methodology that gave the best recoveries for all analytes with one protocol, so our extraction was based on this method with a few optimizations. First, regarding dSPE of honeybees and pollens, PSA/C18 was preferred to PSA/GCB. Indeed, GCB retained apolar analytes such as hexachlorobenzene and aldrin leading to poor recoveries.

One QuEChERS disadvantage is that it leads to lower concentration of the sample compare to other sample preparation method [19]. Indeed, instrumental limits of detection of GC-ToF led to method limits of detection between 0.03 and 0.1 µg/g which are between 3 and 10 times higher than the value of the maximum residue limits required in the European directives [28]. Consequently, a concentration step by evaporation was added which was satisfactory for honey extraction. Nevertheless, regarding honeybees and pollens, further optimization was needed because this concentration step led to strong ion suppression in LC-MS/MS and saturation of the detector in GC-ToF.

GC-ToF analysis of honeybees and pollens extracts revealed high amounts of fatty acids and fatty acid esters. Indeed, these molecules are the main constituents of beeswax [29]. The addition of a very apolar solvent such as hexane in the extraction step has already been proved to be an efficient way to remove this kind of compounds in baby food [4] and was successfully applied to honeybees and pollens. Different volumes of hexane between 1 and 5 mL were tested. Volumes smaller than 3 mL did not remove enough apolar interferences and volumes higher than 3 mL led to low recoveries of apolar pesticides such as hexachlorobenzene and aldrin. Consequently, a final volume of 3 mL of hexane was chosen.

3.1.2. LC-MS/MS

Optimization of chromatographic conditions of multi-residue analysis is always challenging because of the diversity of physicochemical properties of target analytes. In this work, the most difficult part was to find optimum conditions for the class of avermectins. Indeed, these last compounds are macrocyclic lactones. They were rarely included in multi-residue analysis [30] and to the best of our knowledge had never been analyzed in honeybees although their potential toxicity towards insects is known [31].

The most suitable type of LC column for avermectins is C₈ column [32,33]. But a C₈ column did not retain polar compounds, such as methamidophos and carbendazim. A C₁₈ column was also tested but led to poor resolution regarding avermectins. Then, a special type of C₁₈ column, namely “Nucleodur Sphinx RP” from Macherey-Nagel, was tested. Its phase present a balanced ratio of C₁₈ and propylphenyl ligands which allows π - π interactions with aromatic compounds such as avermectins. A better resolution was obtained with this column and two particle size 1.8 and 3 µm were tested in order to increase it as much as possible. As the HPLC system used in this study does not bear high pressure, the flow was limited to 300

$\mu\text{L}/\text{min}$. But even if it is not the optimum flow with a $1.8\ \mu\text{m}$ column, a gain of sensitivity was observed with the $1.8\ \mu\text{m}$ column compare to the $3\ \mu\text{m}$, as seen in Fig. 3a. Finally, the composition of the mobile phase has also to be optimized. Fig. 3b presents the signal to noise of several compounds, with various composition of aqueous phase. For most of the compounds, the best sensitivity is obtained with formic acid. But to analyze avermectins, the presence of ammonium is necessary, especially for abamectin and ivermectin which are not ionized into $[\text{M}+\text{H}]^+$ but in $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. A compromise was found with 0.05% formic acid and ammonium formate at 0.3 mM.

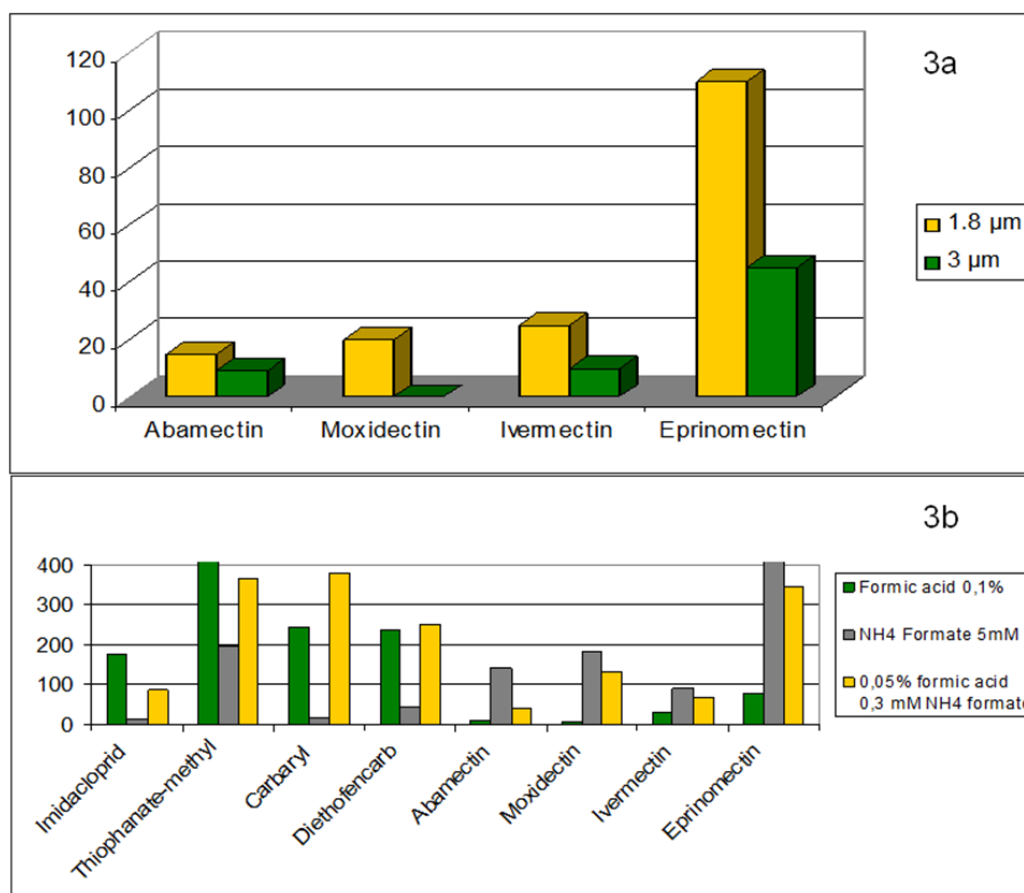


Fig. 3. Optimization of liquid chromatography for avermectins analysis: influence of column granulometry and buffer aqueous phase on signal to noise.

Finally the injection solvent was optimized. For the most polar compounds that are firstly eluted, with an injection solvent composed of only acetonitrile or with a high percentage of acetonitrile, a lack of resolution is observed. Indeed, as the gradient of mobile phase started at 90% of water, it is necessary to have a minimum percentage of water of 90% to obtain a good peak shape. This injection solvent was kept for honey and honeybees. But in

pollens extract, for the latest eluted compounds which are more apolar, the peak area was divided by a factor higher than 10 with an injection solvent which contains 90% of water. This difference may be due to interactions between apolar interferences of the matrix and apolar pesticides, when the percentage of water is too high. Consequently, to analyze pollens extracts, two injections were necessary, one at 90% of water for the earliest eluted compounds (i.e. $t_R < 15$ min (Table 2)) and one at 100% of acetonitrile.

3.1.3. GC-ToF

To improve sensitivity, the noise has to be as low as possible which is not easy in GC-ToF since a reference standard has to be continuously injected in the source to insure good mass accuracy. Consequently, to calibrate the mass spectrometer, it is important to choose a compound which has a mass spectrum with abundant ions in a large mass range such as heptacosane. But during acquisitions, the use of heptacosane as a reference standard led to a high level of noise. To reduce this level, pentafluorochloro benzene was preferred as reference standard during acquisitions.

Another critical parameter regarding the noise is the mass window [20]. As an example, the impact of different values of mass window from 0.02 to 0.1 Da is shown in Fig. 4. This figure represents the extracted ion chromatogram of propiconazole (m/z 259.041) of a standard at 100 $\mu\text{g/L}$ with a zoom on the noise from 8 to 9 min. Thanks to the GC-ToF mass accuracy, it is possible to decrease the mass window, to extract procymidone ion, to 0.02 Da, without decreasing the signal. At the same time, reducing the mass window to 0.02 Da induces a decrease of the noise by a factor of 3. As seen in Table 2, for most of the compounds, good results are obtained with a mass window of 0.02 or 0.03 Da, but for some compounds it is too narrow leading to a decrease of the signal. Consequently it is very important to adjust the mass window for each mass.

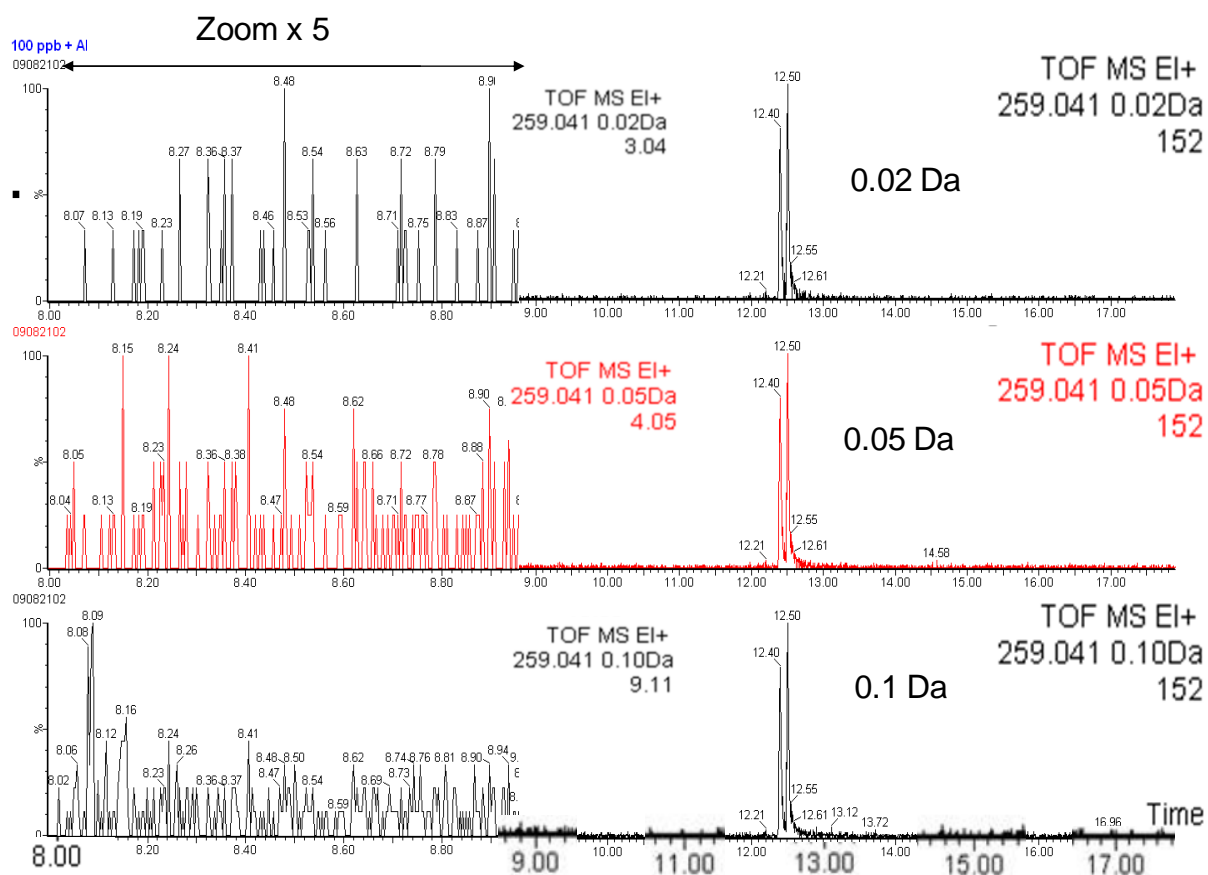


Fig. 4. Influence of mass window width in GC-ToF analysis

3.1.4. Calibration and matrix effect

LC-ESI-MS/MS and GC-EI-MS are both subject to strong matrix effects (ME) which can significantly reduce or enhance the analyte response and lead to wrong quantification. No doubt that applying external calibration to complex matrices such as honey, honeybees and pollens would lead to high errors in quantification. Therefore three calibration strategies could be used in this study: internal standard, standard addition and matrix-matched calibrations. Internal standard calibration is the most efficient method to correct ME but it requires the use of isotope labeled standards of the target analytes [34]. Standard addition is also an efficient method but very time-consuming especially when a large number of samples have to be analyzed. Finally matrix-matched calibration is an efficient method to correct ME, only if a blank matrix is available and if the ion suppression/enhancement effects due to the matrix used for calibration are the same as the effects of the samples analyzed. Indeed, this last condition does not concern honeybees but honeys and pollens samples can be very different

between each other. Previous work on honeys [25] showed different intensities of ME depending on the floral origin of honey, chestnut honey being the type of honey that led to the strongest ME. Regarding pollen samples, their composition depends on the period of sampling, i.e. available flowers for foraging.

In this work, internal standard calibration could not be used because a lot of isotope-labeled standards corresponding to the target analytes were not commercially available or very expensive. One of the objectives of this study was to apply the analytical method to a large number of samples to get an overview of environmental contamination so standard addition calibration could not be used. Finally as blank matrix (see Section 2.2) was available, matrix-matched calibration was used. Even with the use of matrix-matched calibration, our experience on honeys suggests us to look for strategies to reduce ME. Dilution of the extract in LC-MS/MS was chosen. Regarding GC-ToF, the addition of AP based on the work published by Payá et al. [35] was tested. To check the efficiency of this strategy, three honeys of different floral origins were spiked at 60 ng/g, extracted and analyzed with and without AP. Fig. 5 presents the relative standard deviations obtained in these experiments for some compounds. It shows that the addition of AP decreased significantly matrix effects and allowed accurate quantification as discussed in the following section.

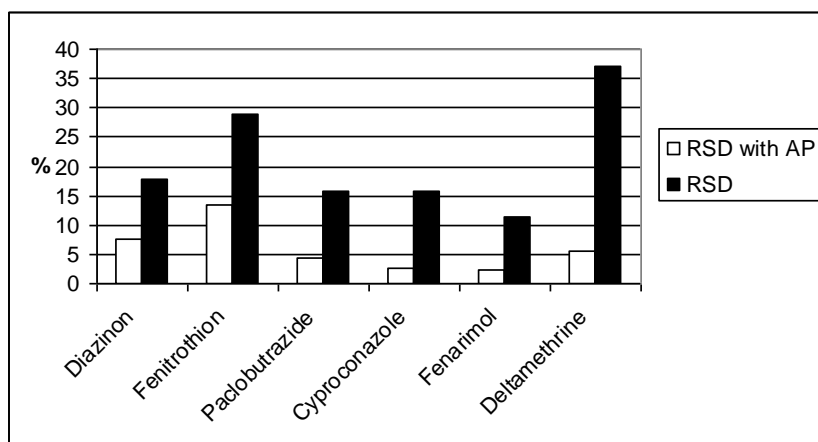


Fig. 5. Influence of the use of analyte protectants on the analysis of honeys of different floral origins by GC-ToF.

3.2. Method validation and performance

The purpose of method validation is to ensure that an analytical methodology is accurate, specific, reproducible and robust over the specified range that a compound will be analyzed [36]. Numerous guidelines have been published regarding method validation but some validation parameters are common. The method validation plan used in this study and calculation of different parameters are described in Section 2.6. Parameters determined were linearity, recovery, repeatability and intermediate precision, over a range of concentration between 4 and 60 ng/g for honeys and honeybees and between 10 and 150 ng/g for pollens due to lower sensitivity in this matrix and limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD). Criteria of validation were as follow: regression coefficient higher than 0.99 for linearity, recoveries between 60 and 120%, RSD lower than 20% for repeatability and lower than 25% for intermediate precision. Results are presented in Tables 4–6 for honeys, honeybees and pollens respectively.

Over the range of concentrations chosen, all the targeted analytes were detected in honeys but 2 compounds (chlorothalonil and procymidone) in honeybees and 5 (dichloran and 4 avermectins) in pollens were not detected. Good linearity was observed for all compounds in the three matrices, even in GC-ToF analysis. Indeed, thanks to the Dynamic Range Enhancement, regression coefficients higher than 0.99 were obtained. Thanks to the extraction, no saturation of the detector was observed except in honeybees and pollens at the same retention time as procymidone and triadimenol which explain their no detection. Nevertheless, triadimenol signal was only interfered in honeybees in which it was still possible to analyze it by LC–MS/MS.

Most RSD of repeatability respect the validation criteria for the three matrices: 18, 18 and 9 compounds present RSD higher than 20% respectively for honey, honeybee, and pollen. Most RSD of intermediate precision respect the validation criteria for honey and honeybees: 16 and 18 compounds present RSD higher than 25% respectively for honey and honeybee. But, regarding pollens, in this complex matrix, 23 compounds present RSD of intermediate precision superior to 30%. The developed extraction method led to good recoveries. Six compounds presented recoveries lower than 60%: Amitraz I, hexachlorobenzene, aldrin in honeybees and pollens and dichlorvos, imazalil, thiophanate-methyl only in pollens. Hexachlorobenzene and aldrin are very apolar compounds ($\text{Log } K_{oc} > 4$, 5 [37]) and a decrease in recovery was observed as soon as hexane was added in the extract. The recovery of thiophanatemethyl can be explained by a relative basicity of pollen matrix to which this

compound is sensitive. Concerning Amitraz I, dichlorvos and imazalil, recoveries are higher than 40%. Despite these recoveries, good RSD of repeatability was obtained and accurate quantification of these compounds was still possible.

Table 4

Method performance and validation: Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ), recoveries (%), repeatability (RSD%) and Inter-day (Inter-d) precision (RSD%) obtained in honeys.

Compound	LC/GC	MRL (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery±RSD%			Inter-d precision		
					<i>n</i> =3			RSD% <i>n</i> =3		
					10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Metamidophos	LC	-	10.0	40.1	70±8	75±13	73±2	9	24	25
Amitraze I	LC	-	10.0	37.0	82±19	76±20	75±17	11	25	24
<i>Carbendazime-d₄</i>	LC	-			91±5	85±5	86±3	11	23	23
Carbendazime	LC	>100	0.5	4.0	103±13	99±7	95±7	10	24	24
Methomyl	LC	20	0.1	10.5	98±6	92±1	94±2	10	24	24
Thiamethoxam	LC	10	0.3	4.0	104±5	94±3	94±2	10	24	24
Clothianidine	LC	10	0.3	4.3	88±1	92±5	89±1	10	24	25
Imidacloprid	LC	50	0.2	3.9	103±4	95±8	93±4	10	24	24
Amitraze II	LC	-	0.3	4.3	102±6	94±5	97±3	11	24	23
Imazalil	LC	50	0.7	4.1	100±6	94±9	95±3	10	24	23
Carbofuran	LC	-	0.03	3.8	103±5	92±5	95±2	10	24	24
Thiophanate-methyl	LC	>100	0.3	10.3	92±34	60±27	74±28	10	24	23
Carbaryl	LC	-	0.1	3.8	99±4	96±1	96±3	9	24	24
<i>Carbaryl-d₇</i>	LC	-			118±4	86±3	96±3	-	-	-
Methiocarbe	LC	50	0.01	4.1	101±2	92±5	96±2	10	23	25
Diethofencarbe	LC	-	0.04	3.8	100±2	91±6	95±1	10	24	24
Cyproconazole	LC	50	0.2	3.5	100±11	88±5	96±4	10	24	22
Triadimenol	LC	-	1.0	6.4	106±4	89±10	97±4	9	21	22
Malathion-d₇	LC	-			100±1	94±3	101±4	10	24	25
Fenoxycarbe	LC	-	0.1	4.1	105±3	90±7	103±7	11	24	21
Iprodione	LC	-	9.7	19.5	91±11	104±17	98±5	12	24	28
Prochloraz	LC	-	0.2	11.4	103±5	89±5	94±1	10	23	26
Clofentezine	LC	-	1.0	3.9	99±12	98±1	104±20	12	22	11
Phoxim	LC	20	0.1	7.3	87±6	91±19	111±13	10	23	14
Coumaphos	LC	-	0.3	3.0	102±11	97±12	108±12	10	24	16
Chlorpyrifos-methyl	LC	-	0.4	5.2	89±12	85±15	115±17	10	24	13
Piperonyl Butoxide	LC	-	0.2	9.0	99±4	93±9	101±7	10	24	20
Pyriproxyfen	LC	50	1.5	4.3	70±11	85±28	119±20	11	22	12

Compound	LC/GC	MRL (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery±RSD%			Inter-d precision		
					n=3			RSD% n=3		
					10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Hexythiazox	LC	-	0.1	4.0	76±3	83±29	121±20	10	24	14
Eprinomectin	LC	-	9.7	29.1	64±19	68±10	107±7	11	22	21
Abamectin	LC	-	10.2	30.6	94±34	81±41	112±17	10	24	27
Moxidectin	LC	-	18.7	nq	nd	±	6±35	nd	12	21
Ivermectin	LC	-	23.5	70.4	nd	95±15	120±17	nd	24	11
Dichlorvos	GC	-	5.8	14.6	136±55	96±9	93±21	36	16	19
Ethoprosfos	GC	-	1.3	6.4	91±4	102±6	98±8	15	8	10
Cadusaphos	GC	-	3.6	8.9	89±2	98±9	102±6	12	7	14
Hexachlorobenzene	GC	-	0.2	3.9	81±5	83±5	94±8	18	13	14
Dimethoate	GC	-	13.6	18.2	nd	136±27	63±30	nd	43	39
Dichloran	GC	-	19.0	57.0	nd	93±23	119±28	nd	20	26
Diazinon	GC	-	7.4	10.5	98±10	100±4	101±5	13	6	7
Lindane	GC	10	1.2	3.4	104±15	91±9	98±4	11	13	6
Chlorothalonil	GC	-	22.2	33.3	nd	23±38	23±40	nd	37	40
Chlorpyrifos-methyl	GC	-	0.1	5.2	84±5	87±5	102±6	19	8	13
Tolclofos-methyl	GC	50	0.1	3.0	88±3	87±2	101±6	22	8	12
Vinclozoline	GC	-	4.0	10.1	78±7	96±1	106±9	25	16	23
Fenitrothion	GC	10	6.2	15.5	96±3	108±12	102±5	18	14	8
Malathion-d₇	GC	-			100±8	92±2	99±4	12	1	5
Malathion	GC	20	5.5	11.7	119±15	89±7	100±2	9	5	3
Chlorpyrifos	GC	-	3.2	8.0	93±6	93±3	103±7	14	5	10
Parathion	GC	-	4.6	11.4	95±8	106±10	100±5	19	16	12
Aldrin	GC	10	0.2	4.5	84±6	86±7	95±7	22	2	12
4,4'-dichlorobenzophenone	GC	-	3.6	17.9	72±7	123±18	121±4	47	40	41
Penconazole	GC	-	5.4	13.5	100±2	98±10	105±7	10	8	13
Phenthoate	GC	-	0.3	14.4	103±6	96±5	101±5	16	12	14
Triadimenol	GC	-	11.2	16.0	93±14	115±15	102±4	18	4	8
Procymidone	GC	-	1.3	3.7	116±23	96±3	100±5	24	9	11
Paclobutrazol	GC	-	7.5	16.2	104±11	115±19	98±7	8	6	10
Endosulfan I	GC	10	5.1	12.7	77±21	83±7	104±10	31	18	18
Bupirimate	GC	-	5.7	14.2	87±7	103±6	105±6	17	9	14
Flusilazole	GC	50	4.1	10.3	105±8	121±18	97±5	17	11	5
Myclobutanil	GC	-	10.7	32.2	67±22	106±12	105±19	26	11	27
Buprofezine	GC	50	23.9	35.9	nd	104±14	94±5	nd	17	9
<i>o,p</i> -DDD	GC	50	0.3	3.7	90±1	89±3	101±6	21	8	13
Dieldrin	GC	10	3.9	29.5	nd	90±1	98±13	nd	14	14
Cyproconazole	GC	50	4.0	10.1	94±4	110±12	104±8	14	8	17
Endosulfan II	GC	10	10.3	30.9	87±20	106±6	104±5	30	11	31

Compound	LC/GC	MRL (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery±RSD%			Inter-d precision		
					<i>n</i> =3			RSD% <i>n</i> =3		
					10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Benalaxyl	GC	-	5.7	14.2	84±6	90±3	102±5	27	10	14
Propiconazole	GC	-	11.1	42.5	114±9	116±10	104±4	18	5	6
Endosulfan sulphate	GC	10	1.2	3.4	95±5	89±9	104±7	22	6	9
<i>p,p</i> -DDT	GC	50	21.9	65.8	nd	nd	91±25	nd	nd	33
Propargite	GC	-	17.1	25.6	nd	115±16	103±5	nd	15	12
Tebuconazole	GC	50	12.8	25.6	112±35	118±17	102±3	44	23	4
Triphenylphosphate	GC	-	0.7	9.3	124±32	96±4	103±4	26	9	12
Piperonyl Butoxide	GC	-	3.6	9.0	91±4	122±14	105±6	5	4	12
Bifenthrine	GC	-	3.3	12.9	85±2	96±4	104±5	22	7	13
Phosmet	GC	50	3.9	9.8	113±14	116±12	99±10	26	36	25
Bromopropylate	GC	100	0.3	3.9	100±5	105±8	105±7	7	5	10
Methoxychlor	GC	-	3.9	9.8	122±15	126±15	105±14	40	40	39
Tetradifon	GC	-	3.3	5.7	75±7	92±2	101±6	26	10	17
Phosalone	GC	50	4.1	10.2	111±7	103±9	101±4	8	13	7
Pyriproxyfen	GC	50	7.5	10.7	84±22	100±6	102±7	28	12	14
Cyhalothrin-lambda	GC	20	6.7	9.6	94±23	100±7	102±6	4	3	8
Fenarimol	GC	-	8.1	16.3	nd	109±1	97±4	nd	10	13
Bitertanol	GC	-	11.0	16.5	110±16	116±26	105±5	nd	5	11
Coumaphos	GC	-	3.7	9.2	128±20	109±14	100±7	26	16	21
Permethrin	GC	-	4.3	10.7	49±19	98±5	89±20	30	28	26
Cyfluthrin	GC	-	12.3	30.8	85±10	110±17	100±7	25	13	9
Cypermethrin	GC	50	4.5	37.6	55±27	102±6	100±11	37	35	39
<i>tau</i> -Fluvalinate	GC	10	3.7	9.1	87±9	115±7	104±7	12	10	11
Esfenvalerate	GC	-	10.1	30.2	nd	102±18	101±7.3	nd	34	15
Deltamethrin	GC	-	6.9	17.3	104±19	104±11	106±10	18	10	17

nd = non detected

Table 5

Method performance and validation: limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recoveries (%), repeatability (RSD%) and inter-day (Inter-d) precision (RSD%) obtained in honeybees.

Compound	LC/GC	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery ±RSD%			Inter-d precision		
				<i>n</i> =3			RSD% <i>n</i> =3		
				10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Metamidophos	LC	0.8	10.0	60±22	67±2	62±1	9	19	19
Amitraze I	LC	18.5	27.8	nd	58±20	57±24	nd	17	20
<i>Carbendazime-d₄</i>	LC			69±8	72±3	74±1	4	17	11

Compound	LC/GC	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery \pm RSD%			Inter-d precision		
				$n=3$			RSD% $n=3$		
				10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Carbendazime	LC	0.6	4.0	76 \pm 19	74 \pm 2	80 \pm 4	10	16	12
Methomyl	LC	0.3	10.5	85 \pm 10	84 \pm 7	86 \pm 3	12	16	10
Thiamethoxam	LC	0.6	4.0	75 \pm 11	83 \pm 3	71 \pm 3	13	21	5
Clothianidine	LC	0.9	10.6	80 \pm 15	75 \pm 2	91 \pm 2	16	16	11
Imidacloprid	LC	0.4	9.6	74 \pm 27	77 \pm 4	83 \pm 2	12	11	3
Amitraze II	LC	4.3	10.8	80 \pm 3	75 \pm 4	81 \pm 5	10	19	6
Imazalil	LC	1.4	10.2	80 \pm 8	72 \pm 6	78 \pm 3	19	20	4
Carbofuran	LC	0.1	3.8	85 \pm 5	79 \pm 1	79 \pm 4	13	10	6
Thiophanate-methyl	LC	4.1	10.3	64 \pm 27	88 \pm 5	63 \pm 21	42	28	11
Carbaryl	LC	0.4	3.8	83 \pm 16	82 \pm 5	89 \pm 2	2	12	5
<i>Carbaryl-d₇</i>	LC			78 \pm 17	85 \pm 7	71 \pm 4	-	-	-
Methiocarbe	LC	0.4	10.3	80 \pm 17	82 \pm 8	80 \pm 4	15	16	6
Diethofencarbe	LC	0.2	3.8	82 \pm 11	84 \pm 3	86 \pm 4	12	4	5
Cyproconazole	LC	2.0	10.1	79 \pm 7	78 \pm 5	95 \pm 3	7	12	9
Triadimenol	LC	9.6	16.0	83 \pm 8	81 \pm 3	90 \pm 1	17	22	12
<i>Malathion-d₇</i>	LC			79 \pm 4	85 \pm 13	85 \pm 5	11	4	10
Fenoxycarbe	LC	0.6	4.1	81 \pm 18	106 \pm 14	83 \pm 19	15	16	19
Iprodione	LC	9.7	19.5	nd	85 \pm 11	117 \pm 6	24	17	28
Prochloraz	LC	0.7	4.6	85 \pm 6	83 \pm 11	99 \pm 1	16	18	4
Clofentezine	LC	1.0	3.9	75 \pm 20	104 \pm 11	79 \pm 20	27	29	20
Phoxim	LC	1.8	7.3	86 \pm 17	100 \pm 1	86 \pm 19	1	25	23
Coumaphos	LC	0.4	3.7	90 \pm 14	107 \pm 13	93 \pm 15	8	24	17
Chlorpyrifos-methyl	LC	5.2	13.0	79 \pm 12	108 \pm 12	95 \pm 17	12	19	13
Piperonyl Butoxide	LC	0.1	3.6	90 \pm 15	94 \pm 11	85 \pm 20	3	24	17
Pyriproxyfen	LC	2.1	4.3	85 \pm 11	99 \pm 11	87 \pm 27	2	26	26
Hexythiazox	LC	0.8	3.9	77 \pm 22	104 \pm 12	88 \pm 18	12	24	13
Eprinomectin	LC	3.9	9.7	66 \pm 7	88 \pm 8	87 \pm 24	33	41	41
Abamectin	LC	10.2	20.4	nd	94 \pm 4	84 \pm 9	nd	23	44
Moxidectin	LC	3.7	9.4	81 \pm 22	96 \pm 13	79 \pm 16	17	37	3
Ivermectin	LC	11.7	23.5	nd	114 \pm 11	71 \pm 22	nd	29	46
Dichlorvos	GC	5.8	14.6	46 \pm 22	90 \pm 11	101 \pm 8	44	10	9
Ethoprofos	GC	0.6	3.6	88 \pm 10	85 \pm 5	91 \pm 11	9	5	9
Cadusaphos	GC	1.0	8.9	85 \pm 7	83 \pm 7	92 \pm 9	6	6	7
Hexachlorobenzene	GC	0.8	3.9	36 \pm 12	41 \pm 8	43 \pm 9	17	6	9
Dimethoate	GC	3.6	27.3	125 \pm 27	92 \pm 8	80 \pm 6	25	11	8
Dichloran	GC	38.0	nd	nd	85 \pm 17	98 \pm 18	nd	14	13
Diazinon	GC	6.3	14.7	83 \pm 22	88 \pm 4	86 \pm 6	19	5	8
Lindane	GC	1.0	5.2	89 \pm 8	89 \pm 7	89 \pm 8	10	10	8

Compound	LC/GC	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery \pm RSD%			Inter-d precision		
				$n=3$			RSD% $n=3$		
				10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Chlorothalonil	GC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Chlorpyrifos-methyl	GC	0.3	5.2	88 \pm 1	86 \pm 8	87 \pm 8	8	8	7
Tolclofos-methyl	GC	0.3	3.0	92 \pm 3	86 \pm 7	89 \pm 8	8	6	7
Vinclozoline	GC	4.0	10.1	61 \pm 5	81 \pm 16	94 \pm 8	19	13	6
Fenitrothion	GC	1.1	6.2	94 \pm 6	98 \pm 4	88 \pm 6	10	10	7
Malathion-<i>d</i>₇	GC			79 \pm 8	92 \pm 6	86 \pm 1	16	9	6
Malathion	GC	7.8	15.6	78 \pm 44	87 \pm 8	94 \pm 10	38	16	8
Chlorpyrifos	GC	0.8	3.2	85 \pm 11	84 \pm 7	85 \pm 11	8	5	8
Parathion	GC	1.6	8.0	90 \pm 6	91 \pm 6	85 \pm 9	5	9	8
Aldrin	GC	4.5	22.3	34 \pm 40	46 \pm 9	50 \pm 9	30	7	7
4,4'-dichlorobenzophenone	GC	3.6	9.0	94 \pm 10	82 \pm 5	89 \pm 6	15	4	8
Penconazole	GC	1.9	13.5	84 \pm 12	88 \pm 18	85 \pm 14	11	17	10
Phenthoate	GC	0.6	14.4	92 \pm 6	91 \pm 6	93 \pm 9	10	7	8
Triadimenol	GC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Procymidone	GC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Paclobutrazol	GC	4.3	10.8	94 \pm 14	102 \pm 16	80 \pm 15	30	31	29
Endosulfan I	GC	5.1	38.0	122 \pm 10	116 \pm 20	62 \pm 17	28	46	34
Bupirimate	GC	5.7	14.2	108 \pm 11	99 \pm 12	89 \pm 12	22	18	20
Flusilazole	GC	2.1	10.3	98 \pm 16	91 \pm 14	90 \pm 10	15	11	9
Myclobutanil	GC	10.7	21.4	nd \pm nd	95 \pm 13	82 \pm 16	nd	26	20
Buprofezine	GC	23.9	71.8	nd	54 \pm 91	58 \pm 34	nd	62	40
<i>o,p</i> -DDD	GC	3.7	9.2	98 \pm 15	91 \pm 11	85 \pm 13	13	14	14
Dieldrin	GC	3.9	9.8	102 \pm 30	86 \pm 18	77 \pm 12	28	15	11
Cyproconazole	GC	1.2	4.0	93 \pm 13	93 \pm 8	92 \pm 11	10	9	9
Endosulfan II	GC	10.3	30.9	68 \pm 24	80 \pm 13	63 \pm 39	27	25	33
Benalaxyl	GC	5.7	28.4	nd	81 \pm 9	88 \pm 5	nd	12	5
Propiconazole	GC	2.6	17.0	95 \pm 5	88 \pm 7	88 \pm 8	4	6	7
Endosulfan sulphate	GC	5.1	8.4	114 \pm 22	100 \pm 15	82 \pm 14	17	20	13
<i>p,p</i> -DDT	GC	1.3	4.4	84 \pm 3	82 \pm 7	75 \pm 11	17	10	12
Propargite	GC	11.9	34.1	nd	126 \pm 16	68 \pm 10	nd	22	26
Tebuconazole	GC	5.1	17.9	90 \pm 16	100 \pm 15	90 \pm 7	22	20	10
Triphenylphosphate	GC	0.4	9.3	91 \pm 5	92 \pm 3	93 \pm 8	11	5	7
Piperonyl Butoxide	GC	1.1	3.6	88 \pm 5	83 \pm 8	87 \pm 9	3	7	7
Bifenthrine	GC	1.3	5.1	78 \pm 2	77 \pm 4	76 \pm 10	8	5	8
Phosmet	GC	9.8	19.7	nd	109 \pm 11	56 \pm 24	nd	38	31
Bromopropylate	GC	0.2	3.9	88 \pm 7	89 \pm 5	90 \pm 8	7	5	7
Methoxychlor	GC	1.2	3.9	102 \pm 1	91 \pm 4	85 \pm 8	9	7	9
Tetradifon	GC	3.3	8.2	102 \pm 9	87 \pm 11	86 \pm 9	16	8	7

Compound	LC/GC	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery ±RSD%			Inter-d precision		
				n=3			RSD% n=3		
				10 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	C2	C4	C6
Phosalone	GC	4.1	10.2	92±35	93±6	75±3	28	9	8
Pyriproxyfen	GC	4.3	10.7	76±15	83±4	86±7	17	3	5
Cyhalothrin-lambda	GC	3.8	9.6	73±6	94±8	86±9	11	11	6
Fenarimol	GC	3.3	8.1	89±5	87±10	88±9	9	9	6
Bitertanol	GC	1.1	4.4	95±6	87±7	90±8	6	8	6
Coumaphos	GC	3.7	9.2	90±14	100±3	81±7	19	17	17
Permethrin	GC	4.3	10.7	89±6	80±9	79±14	9	9	10
Cyfluthrin	GC	12.3	61.5	85±4	89±12	87±4	7	9	3
Cypermethrin	GC	4.5	27.1	97±18	94±8	95±4	32	28	36
<i>tau</i> -Fluvalinate	GC	3.7	9.1	93±4	88±5	92±13	4	6	9
Esfenvalerate	GC	10.1	30.2	105±3	95±9	87±12	23	17	15
Deltamethrin	GC	4.6	16.2	81±6	98±14	81±15	26	20	15

nd = non detected

Table 6

Method performance and validation: limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recoveries (%), repeatability (RSD%) and inter-day (Inter-d) precision (RSD%) obtained in pollens.

Compound	LC/GC	MRL (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery ±RSD%			Inter-d precision		
					n=3			RSD% n=3		
					25 ng/g	75 ng/g	150 ng/g	C2	C4	C6
Metamidophos	LC	-	2.2	25.1	62±10	66±8	63±2	38	24	36
Amitraze I	LC	-	46.3	69.4	nd	40±9	39±4	nd	45	23
<i>Carbendazime-d₄</i>	LC	-			70±2	68±2	63±4	36	21	37
Carbendazime	LC	>100	0.1	1.0	81±3	76±4	68±1	40	27	42
Methomyl	LC	20	0.8	3.2	91±8	84±5	86±1	28	18	32
Thiamethoxam	LC	10	2.0	8.5	85±10	91±19	74±5	9	13	24
Clothianidine	LC	10	1.4	17.0	93±4	94±14	81±7	37	9	36
Imidacloprid	LC	50	2.6	12.0	85±11	89±3	75±7	21	12	21
Amitraze II	LC	-	8.1	17.3	89±7	87±6	84±2	26	14	24
Imazalil	LC	50	6.9	25.5	56±16	58±4	51±8	31	31	39
Carbofuran	LC	-	0.4	1.0	88±8	91±12	85±1	18	11	14
Thiophanate-methyl	LC	>100	16.5	51.5	26±10	14±16	22±12	nd	34	25
Carbaryl	LC	-	0.7	1.2	92±2	90±7	87±6	16	17	18
<i>Carbaryl-d₇</i>	LC	-			88±8	84±4	86±3	-	-	-
Methiocarbe	LC	50	0.2	0.5	108±10	98±13	82±6	5	13	12
Diethofencarbe	LC	-	0.6	1.9	90±8	88±7	86±2	27	27	29

Compound	LC/GC	MRL (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery \pm RSD%			Inter-d precision		
					n=3			RSD% n=3		
					25 ng/g	75 ng/g	150 ng/g	C2	C4	C6
Cyproconazole	LC	50	3.0	10.1	80 \pm 20	93 \pm 20	80 \pm 4	13	21	22
Triadimenol	LC	-	5.6	19.2	70 \pm 18	92 \pm 14	82 \pm 5	43	25	29
Malathion-d₇	LC	-			104 \pm 8	85 \pm 5	80 \pm 6	-	-	-
Fenoxycarbe	LC	-	1.0	3.3	80 \pm 8	80 \pm 5	89 \pm 2	10	2	1
Iprodione	LC	-	15.6	48.7	61 \pm 6	86 \pm 20	88 \pm 15	15	32	27
Prochloraz	LC	-	4.9	14.8	91 \pm 5	70 \pm 11	63 \pm 5	10	8	7
Clofentezine	LC	-	9.7	48.6	69 \pm 13	64 \pm 2	60 \pm 7	7	26	16
Phoxim	LC	20	2.7	15.5	106 \pm 5	84 \pm 3	83 \pm 4	4	7	10
Coumaphos	LC	-	1.8	6.0	93 \pm 9	89 \pm 6	84 \pm 3	6	10	10
Chlorpyrifos-methyl	LC	-	15.6	52.0	83 \pm 25	78 \pm 17	78 \pm 3	20	8	2
Piperonyl Butoxide	LC	-	6.8	22.6	106 \pm 9	96 \pm 6	80 \pm 12	9	3	14
Pyriproxyfen	LC	50	2.1	8.6	92 \pm 7	80 \pm 9	82 \pm 5	10	4	14
Hexythiazox	LC	-	4.8	10.2	94 \pm 15	80 \pm 11	75 \pm 11	12	8	5
Eprinomectin	LC	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Abamectin	LC	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Moxidectin	LC	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ivermectin	LC	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dichlorvos	GC	-	14.6	21.9	54 \pm 14	49 \pm 2	61 \pm 17	17	12	9
Ethoprofos	GC	-	3.2	13.7	72 \pm 8	77 \pm 1	79 \pm 4	6	10	2
Cadusaphos	GC	-	8.9	22.3	70 \pm 13	72 \pm 2	72 \pm 4	5	12	6
Hexachlorobenzene	GC	-	9.7	24.3	25 \pm 67	21 \pm 18	23 \pm 15	18	17	26
Dimethoate	GC	-	9.1	45.4	nd	78 \pm 18	99 \pm 5	nd	35	21
Dichloran	GC	-	47.5	nd	nd	86 \pm 12	126 \pm 7	nd	38	15
Diazinon	GC	-	10.5	26.3	99 \pm 21	85 \pm 5	103 \pm 10	32	25	26
Lindane	GC	10	8.6	17.2	84 \pm 12	84 \pm 12	85 \pm 4	25	15	23
Chlorothalonil	GC	-	11.1	22.2	74 \pm 7	76 \pm 24	78 \pm 11	50	55	50
Chlorpyrifos-methyl	GC	-	1.3	19.5	79 \pm 1	74 \pm 3	78 \pm 4	7	8	3
Tolclofos-methyl	GC	50	1.1	11.4	122 \pm 54	63 \pm 35	77 \pm 3	40	44	30
Vinclozoline	GC	-	1.5	12.6	57 \pm 9	94 \pm 7	87 \pm 2	26	9	11
Fenitrothion	GC	10	3.9	19.4	82 \pm 7	79 \pm 5	83 \pm 4	19	25	26
Malathion-d₇	GC	-			119 \pm 18	75 \pm 13	84 \pm 1	nd	25	12
Malathion	GC	20	39.1	58.6	nd	96 \pm 15	85 \pm 3	nd	40	11
Chlorpyrifos	GC	-	8.0	20.0	55 \pm 16	78 \pm 4	74 \pm 2	28	10	3
Parathion	GC	-	11.4	17.1	86 \pm 2	84 \pm 3	82 \pm 3	12	11	12
Aldrin	GC	10	11.1	13.9	43 \pm 10	42 \pm 9	43 \pm 2	9	10	5
4,4'-dichlorobenzophenone	GC	-	3.1	11.2	78 \pm 13	85 \pm 6	76 \pm 3	16	17	10
Penconazole	GC	-	6.7	16.9	76 \pm 4	83 \pm 6	81 \pm 3	19	27	18
Phenthoate	GC	-	1.4	14.4	81 \pm 3	87 \pm 3	93 \pm 4	9	12	8

Compound	LC/GC	MRL (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery \pm RSD%			Inter-d precision		
					n=3			RSD% n=3		
					25 ng/g	75 ng/g	150 ng/g	C2	C4	C6
Triadimenol	GC	-	16.0	32.0	117 \pm 7	89 \pm 8	82 \pm 7	42	11	36
Procymidone	GC	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Paclobutrazol	GC	-	3.8	10.8	79 \pm 5	92 \pm 1	79 \pm 8	5	14	5
Endosulfan I	GC	10	12.7	31.7	62 \pm 32	66 \pm 15	68 \pm 9	11	12	7
Bupirimate	GC	-	2.8	21.4	101 \pm 12	85 \pm 4	86 \pm 1	23	13	10
Flusilazole	GC	50	3.6	15.5	82 \pm 6	80 \pm 7	81 \pm 4	7	3	7
Myclobutanil	GC	-	10.7	37.5	82 \pm 11	87 \pm 9	84 \pm 2	7	4	9
Buprofezine	GC	50	29.9	59.9	nd	56 \pm 7	77 \pm 2	nd	14	6
<i>o,p</i> -DDD	GC	50	4.6	13.9	83 \pm 6	71 \pm 5	79 \pm 5	35	19	10
Dieldrin	GC	10	9.8	24.6	96 \pm 17	77 \pm 12	71 \pm 3	10	16	9
Cyproconazole	GC	50	10.1	50.4	84 \pm 29	89 \pm 14	79 \pm 4	55	23	8
Endosulfan II	GC	10	15.5	51.5	85 \pm 21	79 \pm 1	81 \pm 3	12	5	8
Benalaxyl	GC	-	21.3	42.7	76 \pm 14	91 \pm 9	86 \pm 3	22	12	6
Propiconazole	GC	-	4.3	85.1	78 \pm 7	88 \pm 7	82 \pm 4	4	16	13
Endosulfan sulphate	GC	10	8.4	21.1	91 \pm 18	85 \pm 9	93 \pm 4	15	22	15
<i>p,p</i> -DDT	GC	50	11.0	27.4	72 \pm 4	75 \pm 4	72 \pm 3	10	7	6
Propargite	GC	-	42.7	128.0	nd	68 \pm 24	82 \pm 5	nd	25	10
Tebuconazole	GC	50	12.8	38.4	76 \pm 13	77 \pm 10	88 \pm 9	42	23	19
Triphenylphosphate	GC	-	0.5	9.3	87 \pm 5	97 \pm 5	91 \pm 3	23	14	13
Piperonyl Butoxide	GC	-	9.0	45.2	76 \pm 4	81 \pm 3	81 \pm 2	18	13	11
Bifenthrine	GC	-	4.5	19.3	72 \pm 2	72 \pm 9	67 \pm 2	19	16	8
Phosmet	GC	50	14.8	24.6	108 \pm 4	65 \pm 35	99 \pm 16	44	48	40
Bromopropylate	GC	100	1.0	14.5	87 \pm 11	85 \pm 8	79 \pm 4	20	18	14
Methoxychlor	GC	-	2.0	9.8	82 \pm 12	81 \pm 2	85 \pm 2	22	4	7
Tetradifon	GC	-	8.2	20.4	67 \pm 22	78 \pm 6	85 \pm 3	9	7	8
Phosalone	GC	50	10.2	15.4	83 \pm 5	77 \pm 11	89 \pm 6	9	10	17
Pyriproxyfen	GC	50	10.7	21.5	71 \pm 3	80 \pm 3	79 \pm 2	18	10	5
Cyhalothrin-lambda	GC	20	23.9	47.9	91 \pm 13	73 \pm 13	89 \pm 0	8	22	19
Fenarimol	GC	-	20.3	28.4	105 \pm 12	83 \pm 14	70 \pm 6	36	12	9
Bitertanol	GC	-	3.9	16.5	76 \pm 8	87 \pm 5	81 \pm 2	15	10	9
Coumaphos	GC	-	4.6	18.4	95 \pm 6	79 \pm 15	95 \pm 6	35	36	29
Permethrin	GC	-	5.3	32.1	72 \pm 7	79 \pm 10	80 \pm 3	23	14	6
Cyfluthrin	GC	-	76.9	230.7	80 \pm 22	62 \pm 12	86 \pm 1	40	28	17
Cypermethrin	GC	50	56.4	169.1	nd	74 \pm 11	90 \pm 8	nd	12	17
<i>tau</i> -Fluvalinate	GC	10	4.6	22.8	79 \pm 8	87 \pm 2	89 \pm 1	12	7	8
Esfenvalerate	GC	-	25.1	150.9	89 \pm 9	56 \pm 3	90 \pm 5	34	31	31
Deltamethrin	GC	-	28.9	57.8	77 \pm 23	69 \pm 16	88 \pm 8	22	40	35

nd = non detected

Seven compounds were troublesome to analyze in the 3 matrices: avermectins by LC–MS/MS and dichloran, dimethoate, chlorothalonil, by GC-ToF. Avermectins' analysis in a multi-residue method is difficult for two reasons. First, as described in Section 3.1.2, the best sensitivity for these compounds is obtained with the presence of ammonium contrary to the other compounds. Secondly, due to their hydrophobic property, they present an affinity to apolar interferences of the matrix that's why none of these compounds were detected in pollens. Nevertheless, acceptable results were obtained in honeybees and in honeys except for moxidectin. Regarding GC-ToF sensitivity of dichloran was quite poor: hence it was possible to analyze it at concentrations higher than 30 ng/g in honeys but in more complex matrices such as honeybees and pollens, it was not possible. Dimethoate and chlorothalonil are well-known [21] for their difficulty to be analyzed because of poor sensitivity and degradation. Therefore it would be interesting to analyze also their degradation products.

Regarding the method performance, eight analytes, in bold in Tables 4–6, were analyzed by LC–MS/MS and GC-ToF. Except for chlorpyrifos-methyl and cyproconazole in LC–MS/MS, LOD obtained with LC–MS/MS are generally lower than with GC-ToF. Besides LOD and LOQ were compared to actual MRL [28] required by the EU directives in honeys and pollens. MRL available are also listed in Tables 4–6. Regarding honeys, LOQ are all lower than MRL except LOQ of fenitrothion, endosulfan I, dieldrin, endosulfan II, and p,p-DDT. Considering pollens, LOQ obtained with LC–MS/MS technique are lower than MRL except for clothianidine, and with GC-ToF, 11 LOQ are higher than MRL. Consequently, the method performance is in concordance with the EU directives concerning the analysis by LC–MS/MS but the sensitivity of GC-ToF is not good enough for some compounds. Concerning honeybees, there is no EU directive, but LOD are lower than 7 ng/g for most compounds, with a highest LOD at 38 ng/g. The method performance is so compatible with analysis of environmental contaminants. In conclusion, this validation study shows the difficulties encountered to analyze compounds with very different physicochemical properties; the developed method allows a global view of the three matrices contamination at low concentration but accurate quantification is not possible for all the compounds.

3.3. Application to real samples

A large sampling of honeybees, trap pollen and honey was performed in 2008 and 2009 but their analysis was done in 2009 and 2010. Consequently it was important to check

that no degradation could occur between sampling and analysis, so the stability of contaminants in the three matrices at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ was studied on 2 years: firstly, 14 samples of each matrix were spiked at 1 and 5 $\mu\text{g/g}$. Six months later 6 of these samples (2 of each matrix) were extracted and analyzed and the others stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then the same experiment was repeated every 3 months for 2 years. Finally, no degradation was observed in these conditions of storing during 2 years.

As detailed in Section 2.6.3, instrumental and extraction performances were checked with the use of isotope labeled standards and Quality Control samples. For compounds that can be analyzed by LC-MS/MS and GC-ToF, results obtained with the two techniques were compared and a good agreement was observed.

Table 7 presents compounds detected in 142 samples of honeys, 145 samples of honeybees and 130 samples of pollens. In total, 36 compounds were detected but only 10 compounds were detected in all the matrices: metabolites of amitraz, carbendazim, thiophanatemethyl, coumaphos, flusilazole, triphenylphosphate, phosmet and tau-fluvalinate. Amitraz, coumaphos and tau-fluvalinate are pesticides that can be used by beekeepers. Triphenylphosphate is not a pesticide but a ubiquitous pollutant that was also detected in water and air by Reemtsma et al. [38]. Considering carbendazim, flusilazole and carbaryl, concentrations found in pollens were significantly higher than in the other matrices. This can be explained by the fact that pollen gives a view of contamination in the shortest period (around 3 days) and so this matrix allows the determination of acute contaminations. Compounds detected and the range of concentrations are comparable with other studies [6,39]. In conclusion, this study allows the comparison of contamination of three matrices: honey is the matrix in which compounds were detected the most frequently in the lowest concentration and pollen the matrix in which compounds were detected the least frequently in the highest concentration, honeybees being the intermediate matrix.

Table 7

List of the 36 compounds detected in real samples: percentage of samples contaminated, and the maximum concentration quantified.

Compound	Honey		Honeybees		Pollen	
	% samples	ng/g Max	% samples	ng/g Max	% samples	ng/g Max
Amitraze I	4	26	5	30	2	115
Carbendazime	64	88	44	66	34	2595
Imidacloprid	2	<LOQ	nd	nd	1	<LOQ
Amitraze II	68	116	15	40	15	129
Imazalil	4	<LOQ	nd	nd	nd	nd
Carbofuran	2	<LOQ	nd	nd	2	2
Thiophanate-methyl	1	5	6	2419	2	3674
Carbaryl	6	<LOQ	2	<LOQ	8	15
Diethofencarbe	1	<LOQ	nd	nd	1	3
Cyproconazole	11	4	nd	nd	1	22
Fenoxycarbe	1	<LOQ	1	20	nd	nd
Iprodione	nd	nd	nd	nd	1	<LOQ
Prochloraz	1	<LOQ	nd	nd	nd	nd
Phoxim	2	<LOQ	nd	nd	nd	nd
Coumaphos	77	29	19	47	10	40
Chlorpyrifos-methyl	1	<LOQ	nd	nd	nd	nd
Piperonyl Butoxide	8	<LOQ	2	<LOQ	nd	nd
Pyriproxyfen	4	<LOQ	1	<LOQ	5	<LOQ
Hexythiazox	1	<LOQ	1	<LOQ	nd	nd
Dimethoate	nd	nd	nd	nd	1	<LOQ
Diazinon	2	14	1	<LOQ	nd	nd
Vinclozoline	nd	nd	nd	nd	2	70
Chlorpyrifos	nd	nd	4	180	4	140
Bupirimate	1	<LOQ	nd	nd	1	<LOQ
Flusilazole	2	<LOQ	2	<LOQ	2	52
Buprofezine	1	43	nd	nd	nd	nd
Dieldrin	nd	nd	nd	nd	1	<LOQ
Endosulfan II	1	<LOQ	nd	nd	nd	nd
Benalaxyl	nd	nd	1	<LOQ	nd	nd
Propiconazole	nd	nd	1	<LOQ	nd	nd
Tebuconazole	1	<LOQ	nd	nd	nd	nd
Triphenylphosphate	2	<LOQ	24	62	10	<LOQ
Phosmet	13	42	3	62	7	78
Phosalone	nd	nd	1	<LOQ	nd	nd
Cypermethrin	1	<LOQ	1	49	nd	nd
tau-Fluvalinate	5	30	7	53	3	85

nd = non detected

4. Conclusion

Combination of a simple extraction method like QuEChERS with sensitive analytical techniques LC-MS/MS and GC-ToF made possible the accurate quantification of contaminants in honey, honeybees and pollen at concentrations as low as 10 ng/g. However, our analytical method comprises certain limitations: first, it does not allow the analysis of avermectins in pollens and these compounds would need the development of a specific method. Second, this study only consider a small number of pesticides metabolites, whereas certain molecules, such as imidacloprid [40] have little chance of being found in their original state, particularly in honeybees. Consequently, there is a need for extensive studies on pesticide mechanisms of metabolism in honeybees, in order to determine the major metabolites and include them in future multiresidue analytical methods. Finally, other apiarian matrices need to be studied. Royal jelly and propolis are increasingly included in cosmetics and foods respectively, making the presence of pesticide in them a potential threat to human health. In addition, wax and beebread are also interesting matrices: since waxes are always recycled by beekeepers, they are a possible source of contamination; beebread should also be studied for two reasons: it is the only source of protein for honeybees in winter and it contains pollens brought by honeybees during the rest of the year. Therefore, it could be used as a long-term surveillance matrix.

To conclude, even though the number of pesticides included in our method is not the most comprehensive found in the literature, to our knowledge our analytical method was developed for one of the largest number of families of contaminants. An extensive application of the final method revealed the presence of a large number of chemical contaminants. Concentrations found are mostly lower than 100 ng/g but some acute contaminations higher than 1 µg/g were detected. These results confirm the potential use of honeybees as environmental bioindicator.

Acknowledgment

This work has been funded by France Agrimer – European program of apiculture which is gratefully acknowledged.

References

- [1] Z. Barganska, J. Namiesnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40 (2010) 159.
- [2] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [3] S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615.
- [4] C. Przybylski, C. Segard, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1858.
- [5] C.C. Leandro, R.J. Fussell, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 207.
- [6] C.A. Mullin, M. Frazier, J.L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, D. vanEngelsdorp, J.S. Pettis, *PLoS One* 5 (2010).
- [7] A.A. Barakat, H.M.A. Badawy, E. Salama, E. Attallah, G. Maatook, *J. Food Agric. Environ.* 5 (2007) 97.
- [8] A. Wilkowska, M. Biziuk, *Food Chem.* 125 (2011) 803.
- [9] M. LeDoux, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1021.
- [10] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* 19 (2008) 906.
- [11] M. García-Chao, M.J. Aguilera, G.F. Calvete, V. Sakkas, M. Llompart, T. Dagnac, *Anal. Chim. Acta* 672 (2010) 107.
- [12] J. Hajslová, J. Zrostlíková, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 181.
- [13] M. Anastassiades, K. Mastovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 163.
- [14] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, *Talanta* 70 (2006) 678.
- [15] M. L'Hostis, H. Pouliquen, Annual report "L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) témoin de la pollution de l'environnement: étude sur un transect paysager en Pays de Loire" (2010).
- [16] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 838.
- [17] NF V03-061; N F EN 15662:2009-01-01 Foods of plant origin—determination of pesticide residues using GC–MS and/or LC–MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE—QuEChERS-method.
- [18] T. Cajka, J. Hajslová, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 251.
- [19] C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 11.
- [20] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 152.
- [21] U. Koesukwiwat, S.J. Lehotay, S. Miao, N. Leepipatpiboon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6692.
- [22] T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 303.

- [23] F. Hernández, T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, *TrAC , Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 388.
- [24] International Conference on Harmonisation (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, 2005.
- [25] D. Debayle, G. Dessalces, M. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1011.
- [26] S. Totti, M. Fernández, S. Ghini, Y. Picó, F. Fini, J. Mañes, S. Girotti, *Talanta* 69 (2006) 724.
- [27] S. Walorczyk, B. Gnusowski, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6522.
- [28] European Commission, *EU Pesticides Database of MRLs*, Regulation (EC) No.396/2005 available at http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.
- [29] A.J.A. Charlton, A. Jones, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 117.
- [30] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196.
- [31] J.E. Losey, M. Vaughan, *BioScience* 56 (2006) 311.
- [32] M.D. Hernando, J.M. Suárez-Barcena, M.J.M. Bueno, J.F. Garcia-Reyes, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1155 (2007) 62.
- [33] K.A. Krogh, E. Björklund, D. Loeffler, G. Fink, B. Halling-Sørensen, T.A. Ternes, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 60.
- [34] A.K. Hewavitharana, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 359.
- [35] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697.
- [36] G.A. Shabir, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 57.
- [37] K.L. Smalling, K.M. Kuivila, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 8.
- [38] T. Reemtsma, J.B. Quintana, R. Rodil, M. Garcia-López, I. Rodriguez, *TrAC , Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 727.
- [39] G. Balayiannis, P. Balayiannis, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55 (2008) 462.
- [40] A. Kamel, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5926.

4.3. Présence généralisée de résidus de produits chimiques dans les matrices apicoles de ruchers appartenant à différents paysages de l'Ouest de la France

Cette partie fait l'objet d'un article soumis en septembre 2012 dans la revue **PLoS ONE** ([Lambert *et al.*, soumis](#)).

Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France

Olivier Lambert^{1,4,5*}, Mélanie Piroux^{1,4,5}, Sophie Puyo¹, Chantal Thorin², Monique L'Hostis¹, Laure Wiest³, Audrey Buleté³, Frédéric Delbac^{4,5} and Hervé Pouliquen¹

1 LUNAM Université, Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Plateforme Environnementale Vétérinaire, Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE), Atlanpole-La Chantrerie, CS40706, Nantes, F-44307, France, **2** LUNAM Université, Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Unité de Physiopathologie animale et pharmacologie fonctionnelle, Atlanpole-La Chantrerie, CS40706, Nantes, F-44307, France, **3** Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, Département Service Central d'Analyse, UMR 5280 CNRS, Université de Lyon1, ENS-Lyon, Villeurbanne, F-69100, France, **4** Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire « Microorganismes : Génome et Environnement », BP 10448, Clermont-Ferrand, F-63000, France, **5** CNRS, UMR 6023, LMGE, Aubière, F-63177, France

* E-mail: olivier.lambert@oniris-nantes.fr

Résumé

Contexte : L'Abeille mellifère, *Apis mellifera*, est fréquemment utilisée comme une sentinelle pour évaluer la pollution environnementale, grâce à ses caractéristiques biologiques. En parallèle, les abeilles mellifères connaissent un déclin récent et dramatique en Europe et aux Etats-Unis, et les produits chimiques, seuls ou en interactions avec d'autres stressseurs, sont suspectés de jouer un rôle central dans l'affaiblissement des colonies. Des échantillons d'abeilles mellifères, de miel et de pollen récoltés dans dix-huit ruchers de l'Ouest de la

France, appartenant à quatre contextes paysagers différents (paysages de type cultures, bocage, urbain, et insulaire) et sur quatre périodes de 2008 et de 2009, ont été analysés pour évaluer la présence de pesticides et de médicaments vétérinaires.

Méthodologie/Résultats : Une analyse multi-résidus de 80 molécules a été réalisée en utilisant une méthode QuEChERS modifiée suivie par de la chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse par temps de vol (GC-ToF) et de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), et a montré que 95,7 %, 72,3 % et 58,6 % des échantillons de miel, d'abeilles et de pollen étaient respectivement contaminés par au moins une molécule. Le nombre de résidus trouvés a été plus important dans les échantillons de miel (n=28) comparativement aux échantillons de pollen (n=23) et d'abeilles (n=20) mais les concentrations les plus élevées ont été déterminées dans le pollen. Bien que la plupart des composés n'ait été que rarement retrouvée, certains ont atteint des concentrations élevées pouvant entraîner des effets néfastes à la santé de l'abeille. Les trois résidus les plus fréquents ont été le carbendazime, un fongicide largement utilisé, et deux acaricides, l'amitraz et le coumaphos, utilisés par les apiculteurs pour contrôler le parasite acarien *Varroa destructor*. Les ruchers en paysage de type cultures ont semblé être plus contaminés que ceux dans les autres contextes paysagers. La contamination des différentes matrices a semblé être plus élevée au début du printemps qu'aux autres périodes de prélèvements.

Conclusions/Portée : Les abeilles mellifères, le miel et le pollen sont des sentinelles appropriées pour évaluer la pollution environnementale par les pesticides et les médicaments vétérinaires. Cette étude a montré la présence généralisée de nombreux résidus dans les matrices apicoles et a soulevé le problème des interactions possibles entre les stressors biologiques, chimiques et physiques, et ses conséquences sur la santé des abeilles mellifères et des autres pollinisateurs.

Abstract

Background: The honeybee, *Apis mellifera*, is frequently used as a sentinel to monitor the environmental pollution due to its biological characteristics. In parallel, honeybees are recently dramatically declining in Europe and USA, and chemical compounds alone or in interactions with other stressors are suspected to play a central place in colony weakening. Honeybee, honey and pollen samples collected in eighteen apiaries of West France from four different landscape contexts (rural-cultivated, rural-grassland, urban and island landscapes)

and during four different periods over 2008 and 2009, were analyzed to monitor the presence of pesticide and veterinary drug residues.

Methodology/Findings: A multi-residue analysis of 80 molecules was done using a modified QuEChERS method followed by GC-ToF and LC-MS/MS and revealed that 95.7%, 72.3% and 58.6% of honey, honeybee and pollen samples were contaminated by at least one molecule, respectively. The number of chemical residues was more important in honey samples (n=28) compared to pollen (n=23) and honeybee (n=20) samples but the highest concentrations were determined in pollen. Although most of compounds were rarely found, some of them reached high concentrations which might lead to adverse effects on bee health. The three most frequent residues were the widely used fungicide carbendazime and two acaricides, amitraz and coumaphos, used by beekeepers to control the parasitic mite *Varroa destructor*. Apiaries in rural-cultivated landscape seemed to be more contaminated than those in other landscape contexts. The contamination of the different matrices was shown to be higher in early spring than in all other periods.

Conclusions/Significance: Honeybees, honeys and pollens are appropriate sentinels for monitoring the environmental pollution by pesticides and veterinary drugs. This study revealed the widespread occurrence of multiple residues in beehive matrices and raised the problem of the possible combinations of biological, chemical and physical stressors and its consequences for honeybee and other pollinator health.

Introduction

Since the middle of the twentieth century, profound changes occurred and damaged ecological balances. Industrialization, growing urbanization, transports and agricultural practices led to an ecosystem overall contamination and to major modifications in landscape structure and composition. Those changes had adverse effects on biodiversity, causing physiological and behavioral damages on living organisms, and altering both the habitats and the quality and/or the quantity of food resources [1–5]. Consequences are disastrous particularly as supplementary stressors, such as infectious agents or invasive species, may be added [6–9].

Bees are in the central point of this problematic. Firstly, honeybees are dramatically declining both in Europe and USA over the last decade [10]. Multiple causes are suspected such as (i), climate change, (ii), reduction of floral diversity and quality resources in relation

to mono-cultural practices and fragmentation of natural habitats, (iii), infection by pathogens including viruses, bacteria, fungi and parasites [11–13], and (iv), poisoning by chemicals compounds including pesticides [14]. Even if each cause may have a real impact on the honeybee health, no factor has nowadays emerged as the definitive and single stressor responsible of this decline. Thus, a combination of biological, chemical and physical stressors would be the most probable explanation for extensive colony losses. In particular, recent studies reported that parasite-insecticide interactions can synergistically and negatively affect honeybee survival [15–19]. Secondly, honeybee and other beehive matrices are recognized as appropriate sentinels to monitor the anthropogenic contamination in the environment [20–21]. Honeybees are exposed to atmospheric pollutants during their foraging activities, their hairy bodies easily holding residues, and may be exposed *via* contaminated food resources such as nectar, pollen or water. So many studies used honeybee, pollen or honey as relevant matrices to assess the levels of heavy metals [22–23] and polycyclic aromatic hydrocarbons [24] in both wild and anthropogenic areas, but also of pesticides in agricultural areas [25–28].

In this context, the Wildlife and Ecosystems Veterinary Center from Pays de la Loire (CVFSE/Oniris) conducted a program concerning the use of honeybees (*Apis mellifera* L.), honey and pollen to monitor the environmental pollution by lead [29], polycyclic aromatic hydrocarbons [30] and pesticides in Pays de la Loire (West France). The aim of the present study was to investigate the contamination of 18 apiaries by pesticide residues through analyses of 3 different matrices during 2 years (2008 and 2009). The sampling apiaries were located in four different landscapes susceptible to reflect various contamination levels due to different uses of pesticides and veterinary drugs (gardening, agricultural, herd breeding or apicultural practices). To our knowledge, this study is the first to compare the contamination of 3 matrices in 4 different landscape contexts. The temporal distribution of pesticide and veterinary drug concentrations and the choice of the most relevant matrices for monitoring environmental pesticide and veterinary drug contamination are discussed.

Materials and Methods

Study sites

Apicultural matrices were collected from 18 apiaries (designed from A to P, IO and IY) located in four different landscapes from West France (Bretagne and Pays de la Loire)

(Fig. 1). Two apiaries were located on small islands (Isle of Ouessant, IO, and Isle of Yeu, IY) free from high anthropogenic activities and selected to represent low levels of pesticides. Six apiaries (A, F, H, I, M and O) were located in a rural-grassland landscape characterized by high length of hedges and numerous grassland plots. Five apiaries (B, D, G, J and L) were located in a rural-cultivated landscape characterized by large plots of crops (permanent, oleaginous, grain crops, market gardening) and a low hedgerow network. Those 11 rural-sites may display levels of pesticides reflecting agricultural practices and veterinary treatments in farm animals. Finally, five apiaries were located in an urban landscape characterized by large urban areas and some rural areas (C, E, K, N and P); those apiaries may show pesticides used in leisure gardening and few pesticides emanating from agricultural treatments.

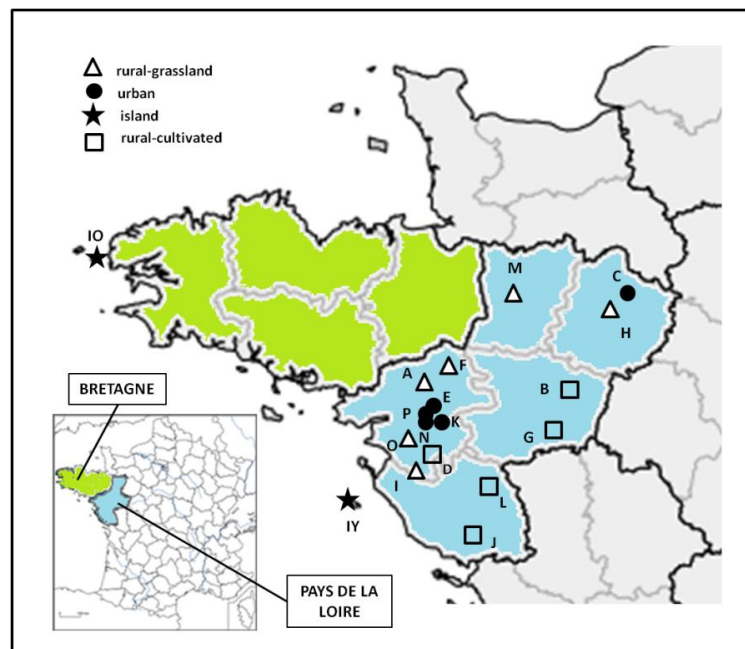


Figure 1. Location of the 18 surveyed apiaries. The apiaries are located in four different landscape contexts (rural-grassland landscapes: A, F, H, I, M and O; rural-cultivated landscapes: B, D, G, J and L; urban landscapes: C, E, K, N and P; islands: IO and IY) from two regions of West France (Bretagne in green and Pays de la Loire in blue).

Sample collection

Three different biological matrices (foraging honeybees, trap pollen and honey) were collected from eight colonies randomly selected in each apiary. Samples were always collected from the same eight colonies during the survey. Otherwise the number of hives sampled was kept similar by replacement of each dead colony. Apiaries were visited four times in both 2008 (periods 1 to 4) and 2009 (periods 5 to 8): in spring (late April-early May,

periods 1 and 5), at the beginning of summer (late June-early July, periods 2 and 6), in summer (late July-early August, periods 3 and 7), and at the beginning of autumn (late September-early October, periods 4 and 8). For a same period, all samples were performed when possible in a 10-day time laps to minimize important variations in climatic factors, flowering and pesticide treatments. No specific permits were required for this field study. Owners of studied apiaries were present for each sampling and their name is kept confidential.

Honeybees were directly collected on the hive's flight board with a hand dryer. Pollens were collected in pollen traps activated by beekeepers three days before the sampling. As foraging activities depend on the meteorological conditions, some pollen samples were missing due to low temperatures or bad weather especially at the beginning of autumn. Honey samples were collected from several honeycombs with a cutter or with a punch. Uncapped honeycombs were chosen (when possible in beehive rises) to collect fresh honey. In a same apiary, each colony shows specific foraging activities which may not be representative of the whole apiary. However, to answer to the aim of this study, *i.e.* the use of the apicultural matrices as sentinels for monitoring the contamination by pesticides and veterinary drugs around or in each apiary, samples of honeybees, honey and pollen collected in the hives of the same apiary and at the same period were pooled by biological matrices. Field collected pools were immediately placed on ice after sampling and then stored at -20°C until analysis. The total numbers of collected samples were 141 for honeybees, 141 for honey and 128 for pollen.

Sample preparation, analysis and method performance

A multi-residue analysis was developed to identify and quantify 80 pesticides (gardening and agricultural) and veterinary drugs in the three beehive matrices. The 80 compounds covered 21 families of contaminants and corresponded to a majority of pesticides used for plant protection and some veterinary drugs used for treatments of farm animals or in apicultural practices to control the parasitic mite *Varroa destructor* (**Table 1**). The method consisted in a single extraction, based on a modified “QuEchERS method”, followed by gas chromatography coupled with Time of Flight mass spectrometry (GC-ToF) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described [31]. Combination of the “QuEchERS method” with sensitive analytical techniques GC-ToF and LC-MS/MS allowed to detect pesticide concentrations as low as 10 ng/g in honeybee, honey and pollen samples. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of each chemical compound are given in **Table 1**.

Table 1. Method, limits of detection and limits of quantification for the 80 compounds analyzed for beehive matrices from West France honeybee colonies.

Compound	Method ¹	Class ²	Effect ³	Honeybees		Honey		Pollen	
				LOD ⁴	LOQ ⁵	LOD ⁴	LOQ ⁵	LOD ⁴	LOQ ⁵
4,4'-dichlorobenzophenone	GC	OC	A	3.6	9.0	3.6	17.9	3.1	11.2
Abamectin	LC	AVER	I	10.2	20.4	10.2	30.6	nd	nd
Aldrin	GC	OH	I	4.5	22.3	0.2	4.5	11.1	13.9
Amitraz I	LC	FORM	I	18.5	27.8	10.0	37.0	46.3	69.4
Amitraz II	LC	FORM	I	4.3	10.8	0.3	4.3	8.1	17.3
Benalaxyl	GC	PHENA	F	5.7	28.4	5.7	14.2	21.3	42.7
Bifenthrin	GC	PYRE	I	1.3	5.1	3.3	12.9	4.5	19.3
Bitertanol	GC	TRIA	F	1.1	4.4	11.0	16.5	3.9	16.5
Bromopropylate	GC	CARBI	A	0.2	3.9	0.3	3.9	1.0	14.5
Bupirimate	GC	PYRI	F	5.7	14.2	5.7	14.2	2.8	21.4
Buprofezine	GC	THIAD	I	23.9	71.8	23.9	35.9	29.9	59.9
Cadusaphos	GC	OP	N	1.0	8.9	3.6	8.9	8.9	22.3
Carbaryl	LC	CARB	I	0.4	3.8	0.1	3.8	0.7	1.2
Carbendazime	LC	CARB	F	0.6	4.0	0.5	4.0	0.1	1.0
Carbofuran	LC	CARB	I	0.1	3.8	0.03	3.8	0.4	1.0
Chlorothalonil	GC	ISOP	F	nd	nd	22.2	33.3	11.1	22.2
Chlorpyrifos	GC	OP	I	0.8	3.2	3.2	8.0	8.0	20.0
Chlorpyrifos-methyl	GC	OP	I	0.3	5.2	0.1	5.2	1.3	19.5
Clofentezine	LC	QUIN	A	1.0	3.9	1.0	3.9	9.7	48.6
Clothianidine	LC	NEO	I	0.9	10.6	0.3	4.3	1.4	17.0
Coumaphos	LC	OP	I	0.4	3.7	0.3	3.0	1.8	6.0
Cyfluthrin	GC	PYRE	I	12.3	61.5	12.3	30.8	76.9	230.7
Cyhalothrin-lambda	GC	PYRE	I	3.8	9.6	6.7	9.6	23.9	47.9
Cypermethrin	GC	PYRE	I	4.5	27.1	4.5	37.6	56.4	169.1
Cyproconazole	LC	TRIA	F	2.0	10.1	0.2	3.5	3.0	10.1
Deltamethrin	GC	PYRE	I	4.6	16.2	6.9	17.3	28.9	57.8
Diazinon	GC	OP	I	6.3	14.7	7.4	10.5	10.5	26.3
Dichloran	GC	OH	I	38.0	nd	19.0	57.0	47.5	nd
Dichlorvos	GC	OP	I	5.8	14.6	5.8	14.6	14.6	21.9
Dieldrin	GC	OH	I	3.9	9.8	3.9	29.5	9.8	24.6
Diethofencarbe	LC	CARB	F	0.2	3.8	0.04	3.8	0.6	1.9
Dimethoate	GC	OP	I	3.6	27.3	13.6	18.2	9.1	45.4
Endosulfan I	GC	OH	I	5.1	38.0	5.1	12.7	12.7	31.7
Endosulfan II	GC	OH	I	10.3	30.9	10.3	30.9	15.5	51.5
Endosulfan sulphate	GC	OH	I	5.1	8.4	1.2	3.4	8.4	21.1
Eprinomectin	LC	AVER	I	3.9	9.7	9.7	29.1	nd	nd
Esfenvalerate	GC	PYRE	I	10.1	30.2	10.1	30.2	25.1	150.9
Ethoprofos	GC	OH	I	0.6	3.6	1.3	6.4	3.2	13.7
Fenarimol	GC	CARBI	F	3.3	8.1	8.1	16.3	20.3	28.4
Fenitrothion	GC	OP	I	1.1	6.2	6.2	15.5	3.9	19.4
Fenoxycarbe	LC	CARB	I	0.6	4.1	0.1	4.1	1.0	3.3
Flusilazole	GC	TRIA	F	2.1	10.3	4.1	10.3	3.6	15.5
Hexachlorobenzene	GC	OH	F	0.8	3.9	0.2	3.9	9.7	24.3
Hexythiazox	LC	THIAZ	A	0.8	3.9	0.1	4.0	4.8	10.2

Imazalil	LC	IMI	F	1.4	10.2	0.7	4.1	6.9	25.5
Imidacloprid	LC	NEO	I	0.4	9.6	0.2	3.9	2.6	12.0
Iprodione	LC	DICA	F	9.7	19.5	9.7	19.5	15.6	48.7
Ivermectin	LC	AVER	I	11.7	23.5	23.5	70.4	nd	nd
Lindane	GC	OH	I	1.0	5.2	1.2	3.4	8.6	17.2
Malathion	GC	OP	I	7.8	15.6	5.5	11.7	39.1	58.6
Metamidophos	LC	OP	I	0.8	10.0	10.0	40.1	2.2	25.1
Methiocarbe	LC	CARB	M	0.4	10.3	0.01	4.1	0.2	0.5
Methomyl	LC	CARB	I	0.3	10.5	0.1	10.5	0.8	3.2
Methoxychlor	GC	OH	I	1.2	3.9	3.9	9.8	2.0	9.8
Moxidectin	LC	AVER	I	3.7	9.4	18.7	nd	nd	nd
Myclobutanil	GC	TRIA	F	10.7	21.4	10.7	32.2	10.7	37.5
o,p DDD	GC	OH	I	3.7	9.2	0.3	3.7	4.6	13.9
p,p-DDT	GC	OH	I	1.3	4.4	21.9	65.8	11.0	27.4
Paclbutrazol	GC	TRIA	F	4.3	10.8	7.5	16.2	3.8	10.8
Parathion	GC	OP	I	1.6	8.0	4.6	11.4	11.4	17.1
Penconazole	GC	TRIA	F	1.9	13.5	5.4	13.5	6.7	16.9
Permethrin	GC	PYRE	I	4.3	10.7	4.3	10.7	5.3	32.1
Phenthoate	GC	OP	I	0.6	14.4	0.3	14.4	1.4	14.4
Phosalone	GC	OP	I	4.1	10.2	4.1	10.2	10.2	15.4
Phosmet	GC	OP	I	9.8	19.7	3.9	9.8	14.8	24.6
Phoxim	LC	OP	I	1.8	7.3	0.1	7.3	2.7	15.5
Piperonyl Butoxyde	LC	BENZ	I	0.1	3.6	0.2	9.0	6.8	22.6
Prochloraz	LC	IMI	F	0.7	4.6	0.2	11.4	4.9	14.8
Procymidone	GC	DICA	F	nd	nd	1.3	3.7	nd	nd
Propargite	GC	SULES	A	11.9	34.1	17.1	25.6	42.7	128.0
Propiconazole	GC	TRIA	F	2.6	17.0	11.1	42.5	4.3	85.1
Pyriproxyfen	LC	PHENP	I	2.1	4.3	1.5	4.3	2.1	8.6
Tau-fluvalinate	GC	PYRE	I	3.7	9.1	3.7	9.1	4.6	22.8
Tebuconazole	GC	TRIA	F	5.1	17.9	12.8	25.6	12.8	38.4
Tetradifon	GC	OH	I	3.3	8.2	3.3	5.7	8.2	20.4
Thiamethoxam	LC	NEO	I	0.6	4.0	0.3	4.0	2.0	8.5
Thiophanate-methyl	LC	CARB	F	4.1	10.3	0.3	10.3	16.5	51.5
Tolclofos-methyl	GC	OP	I	0.3	3.0	0.1	3.0	1.1	11.4
Triadimenol	LC	TRIA	F	9.6	16.0	1.0	6.4	5.6	19.2
Triphenylphosphate	GC	OP	I	0.4	9.3	0.7	9.3	0.5	9.3
Vinclozoline	GC	DICA	F	4.0	10.1	4.0	10.1	1.5	12.6

¹Method: LC = liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); GC = gas chromatography coupled with Time of Flight mass spectrometry (GC-ToF).

²Class: AVER = avermectine; BENZ = benzodioxole; CARB = carbamate; CARBI = carbinole; DICA = dicarboximide; FORM = formamidin; IMI = imidazole; ISOP = isophtalonitrile; NEO = neonicotinoid; OC = organochloride; OH = organohalogenus; OP = organophosphorus; PHENA = phenylamide; PHENP = phenylpyrazole; PYRE = pyrethroid; PYRI = pyrimidin; QUIN = quinoxaline; SULES = sulfite ester; THIAZ = thiazolidinone; TRIA = triazole

³Effect: A = acaricide; F = fungicide; I = insecticide; M = molluscicide; N = nematodicide

⁴LOD = limit of detection in ng/g; nd = not determined.

⁵LOQ = limit of quantification in ng/g; nq = not determined.

Statistical analyses

For each matrix, statistical analyses were realized only for residues which were detected or quantified at least once. The statistical parameters for concentrations (mean, median and standard deviation) were calculated from all the analyzed samples of each matrix and not only from samples for which residues were detected or quantified. When a compound was not detected ($< \text{LOD}$, limit of detection), the concentration used for statistical analysis was $\frac{1}{2} \text{LOD}$. When a compound was not quantified ($> \text{LOD}$ and $< \text{LOQ}$, limit of quantification), the concentration used was $\frac{1}{2} (\text{LOD} + \text{LOQ})$.

A Student's test (parametric test for non paired data) was used for (i) the comparison of the residue mean number detected or quantified in honeybees ($n=141$), honey ($n=141$) and pollen ($n=128$), (ii) the comparison of the residue mean number found in each landscape structure (rural-grassland, rural-cultivated, urban and island), and (iii) the comparison of the residue mean number found by sampling period ($n=8$). Significant difference was considered for a 5% first type error ($\alpha = 5\%$).

Results

Multiple contaminant residues detected in honeybee, honey and pollen matrices

Among the 141 honeybee, 141 honey and 128 pollen samples collected in 18 apiaries during 2008 and 2009, 102 (72.3%), 135 (95.7%) and 75 (58.6%) samples were contaminated by at least one contaminant, respectively.

Twenty compounds were detected in honeybees (**Table 2**) with up to 6 different residues in a single sample and a mean of 1.4 residues per analyzed sample. In this matrix, 36.2% of samples contained at least 2 residues, and 18.4% at least 3 residues. Twenty eight compounds were detected in honey (**Table 3**) with up to 8 different residues in a single sample and a mean of 2.9 residues per analyzed sample. In this matrix, 80.8% of samples contained at least 2 residues and more than 3 residues were detected in 57.4% of these samples. Twenty three compounds were detected in pollen (**Table 4**) with up to 7 different residues in a single sample and a mean of 1.1 residues per analyzed sample. In this matrix, 30.5% of samples contained at least 2 residues, and 11.7% at least 3 residues. Student test showed highly significant differences ($\alpha = 5\%$) between residue concentrations in honey samples compared to bee ($p\text{-value} = 2.296 \cdot 10^{-16}$) and pollen samples ($p\text{-value} < 2.2 \cdot 10^{-16}$).

A total of 36 different compounds were detected when considering all the matrices (**Tables 2, 3 and 4**) and only 12 were shared by the three matrices: 3 acaricides (2 metabolites of amitraz, amitraz I and amitraz II, and coumaphos), 3 fungicides (carbendazime, flusilazole and thiophanate-methyl) and 6 insecticides (carbaryl, phosmet, piperonyl butoxide, pyriproxyfen, tau-fluvalinate and triphenylphosphate).

Table 2. Summary of contaminant residues detections in honeybee samples from West France honeybee colonies.

Compound	Class ¹	Effect ²	% ³	Detections				
				Min ⁴	Max ⁴	Mean ⁵	Median ⁵	SD ⁵
Amitraz I	FORM	A	5.0	> LOD and < LOQ	29.60	9.99	9.25	3.27
Amitraz II	FORM	A	16.3	> LOD and < LOQ	17.00	3.07	2.15	2.41
Benalaxyl	PHENA	F	1.4	> LOD	< LOQ	3.05	2.85	1.69
Carbaryl	CARB	I	2.1	> LOD	< LOQ	0.24	0.20	0.28
Carbendazime	CARB	F	41.1	> LOD and < LOQ	66.30	2.04	0.30	6.59
Chlorpyrifos	OP	I	3.5	> LOD and < LOQ	180.20	1.72	0.40	15.14
Coumaphos	OP	A	17.8	> LOD and < LOQ	47.30	1.04	0.20	4.33
Cypermethrin	PYRE	I	1.4	28.50	48.80	2.52	2.00	4.52
Diazinon	OP	I	0.7	> LOD	< LOQ	3.20	3.15	0.62
Fenoxycarb	CARB	I	0.7	20.10	20.10	0.44	0.30	1.67
Flusilazole	TRIA	F	1.4	> LOD	< LOQ	1.12	1.05	0.61
Hexythiazox	THIAZ	A	0.7	> LOD	< LOQ	0.41	0.40	0.16
Phosalone	OP	I	0.7	> LOD	< LOQ	2.09	2.05	0.43
Phosmet	OP	I	2.8	> LOD and < LOQ	62.20	5.52	4.90	5.01
Piperonyl Butoxide	BENZ	I	2.1	> LOD	< LOQ	0.09	0.05	0.26
Propiconazole	TRIA	F	1.4	> LOD and < LOQ	7.80	0.37	0.30	0.65
Pyriproxyfen	PHENP	I	1.4	> LOD	< LOQ	1.08	1.05	0.26
Tau-fluvalinate	PYRE	I	7.1	> LOD and < LOQ	52.90	3.41	1.85	7.20
Thiophanate-methyl	CARB	F	5.7	> LOD and < LOQ	2418.70	22.96	2.05	207.54
Triphenylphosphate	OP	I	24.8	> LOD and < LOQ	61.60	1.95	0.20	5.86

¹Class: BENZ = benzodioxole; CARB = carbamate; FORM = formamidin; OP = organophosphorus; PHENA = phenylamide; PHENP = phenylpyrazole; PYRE = pyrethroid; THIAZ = thiazolidinone; TRIA = triazole.

²Effect: A = acaricide; F = fungicide; I = insecticide.

³n = 141 honeybee samples.

⁴Min = minimum in ng/g; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification.

⁵Mean, Median and SD (standard deviation) were calculated taking into account all the analyzed samples.

Table 3. Summary of contaminant residues detections in honey samples from West France honeybee colonies.

Compound	Class ¹	Effect ²	% ³	Detections				
				Min ⁴	Max ⁴	Mean ⁵	Median ⁵	SD ⁵
Amitraz I	FORM	A	4.2	> LOD and < LOQ	26.00	5.65	5.00	3.29
Amitraz II	FORM	A	68.8	> LOD and < LOQ	116.10	10.21	2.30	18.62
Bupirimate	PYRI	F	1.4	> LOD	< LOQ	2.95	2.85	0.84
Buprofezin	THIAD	I	1.4	> LOD and < LOQ	42.80	12.30	11.95	3.00
Carbaryl	CARB	I	6.4	> LOD and < LOQ	4.10	0.18	0.05	0.53
Carbendazime	CARB	F	64.5	> LOD and < LOQ	87.90	2.89	2.25	8.42
Carbofuran	CARB	I	2.1	> LOD	< LOQ	0.06	0.02	0.28
Chlorpyrifos-methyl	OP	I	1.4	> LOD	< LOQ	0.24	0.20	0.31
Coumaphos	OP	A	78.0	> LOD and < LOQ	56.40	2.48	1.65	5.69
Cypermethrin	PYRE	I	0.7	> LOD	< LOQ	2.38	2.25	1.58
Cyprocanazole	TRIA	F	11.3	> LOD and < LOQ	3.80	0.31	0.10	0.62
Diazinon	OP	I	2.1	> LOD and < LOQ	14.00	3.85	3.70	1.06
Diethofencarb	CARB	F	0.7	> LOD	< LOQ	0.03	0.02	0.16
Endosulfan-beta	OH	I	0.7	> LOD	< LOQ	5.26	5.15	1.30
Fenoxycarb	CARB	I	0.7	> LOD	< LOQ	0.06	0.05	0.17
Flusilazole	TRIA	F	2.1	> LOD	< LOQ	2.16	2.05	0.75
Hexythiazox	THIAZ	A	1.4	> LOD	< LOQ	0.08	0.05	0.24
Imazalil	IMI	F	4.2	> LOD	< LOQ	0.44	0.35	0.42
Imidacloprid	NEO	I	2.1	> LOD	< LOQ	0.14	0.10	0.28
Phosmet	OP	I	12.8	> LOD and < LOQ	42.10	3.57	1.95	5.07
Phoxim	OP	I	2.1	> LOD	< LOQ	0.13	0.05	0.53
Piperonyl Butoxide	BENZ	I	8.5	> LOD	< LOQ	0.48	0.10	1.26
Prochloraz	IMI	F	1.4	> LOD	< LOQ	0.18	0.10	0.68
Pyriproxyfen	PHENP	I	3.5	> LOD	< LOQ	0.83	0.75	0.40
Tau-fluvalinate	PYRE	I	5.0	> LOD and < LOQ	30.00	2.30	1.85	2.73
Tebuconazole	TRIA	F	0.7	> LOD	< LOQ	6.49	6.40	1.08
Thiophanate-methyl	CARB	F	1.4	4.00	5.30	0.21	0.15	0.54
Triphenylphosphate	OP	I	2.1	> LOD	< LOQ	0.45	0.35	0.67

¹Class: BENZ = benzodioxole; CARB = carbamate; FORM = formamidin; IMI = imidazole; NEO = neonicotinoid; OH = organohalogenus; OP = organophosphorus; PHENP = phenylpyrazole; PYRE = pyrethroid; PYRI = pyrimidin; THIAD = thiadiazin; THIAZ = thiazolidinone; TRIA = triazole.

²Effect: A = acaricide; F = fungicide; I = insecticide.

³n = 141 honey samples.

⁴Min = minimum in ng/g; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification.

⁵Mean, Median and SD (standard deviation) were calculated taking into account all the analyzed samples.

Table 4. Summary of contaminant residues detections in pollen samples from West France honeybee colonies.

Compound	Class ¹	Effect ²	% ³	Detections				
				Min ⁴	Max ⁴	Mean ⁵	Median ⁵	SD ⁵
Amitraz I	FORM	A	1.6	> LOD and < LOQ	115.20	24.14	23.15	8.67
Amitraz II	FORM	A	14.8	> LOD and < LOQ	129.40	7.39	4.10	13.82
Bupirimate	PYRI	F	0.8	> LOD	< LOQ	1.48	1.40	0.95
Carbaryl	CARB	I	7.8	> LOD and < LOQ	14.67	0.70	0.35	1.68
Carbendazime	CARB	F	34.4	> LOD and < LOQ	2595.00	24.31	0.05	229.47
Carbofuran	CARB	I	1.6	> LOD and < LOQ	2.30	0.22	0.20	0.19
Chlorpyrifos	OP	I	3.9	> LOD and < LOQ	139.50	5.61	4.00	12.53
Coumaphos	OP	A	3.9	> LOD and < LOQ	40.40	1.95	0.90	5.10
Cyprocanazole	TRIA	F	0.8	22.30	22.30	1.66	1.50	1.84
Dieldrin	OH	I	0.8	> LOD	< LOQ	5.0	4.90	1.09
Diethofencarb	CARB	F	0.8	2.60	2.60	0.32	0.30	0.32
Dimethoate	OP	I	0.8	> LOD	< LOQ	4.73	4.55	2.01
Flusilazole	TRIA	F	2.3	19.90	51.60	2.60	1.80	5.53
Imidacloprid	NEO	I	0.8	> LOD	< LOQ	1.35	1.30	0.53
Iprodione	DICA	F	0.8	> LOD	< LOQ	7.99	7.80	2.15
Phosmet	OP	I	7.4	> LOD and < LOQ	78.10	9.38	7.40	8.80
Piperonyl Butoxide	BENZ	I	0.8	> LOD	< LOQ	3.49	3.40	1.00
Pyriproxyfen	PHENP	I	4.7	> LOD	< LOQ	5.85	5.35	2.28
Tau-fluvalinate	PYRE	I	3.1	> LOD and < LOQ	85.42	3.52	2.30	8.31
Thiophanate-methyl	CARB	F	1.6	1395.00	3674.00	47.72	8.25	345.52
Triadimenol	TRIA	F	2.3	34.30	35.70	8.64	8.00	4.12
Triphenylphosphate	OP	I	9.4	> LOD	< LOQ	0.69	0.25	1.36
Vinclozolin	DICA	F	0.8	70.31	70.31	1.29	0.75	6.15

¹Class: BENZ = benzodioxole; CARB = carbamate; DICA = dicarboximide; FORM = formamidin; NEO = neonicotinoid; OH = organohalogenus; OP = organophosphorus; PHENP = phenylpyrazole; PYRE = pyrethroid; PYRI = pyrimidin; TRIA = triazole.

²Effect: A = acaricide; F = fungicide; I = insecticide.

³n = 128 honeybee samples.

⁴Min = minimum in ng/g; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification.

⁵Mean, Median and SD (standard deviation) were calculated taking into account all the analyzed samples.

Main detected contaminant residues and their concentrations in the three beehive matrices

The most frequently found residues (in more than 10% of samples) were 1/ carbendazime (41.1%), triphenylphosphate (24.8%), coumaphos (17.8%) and amitraz II (16.3%) in honeybees (**Table 2**), 2/ coumaphos (78.0%), amitraz II (68.8%), carbendazime (64.5%), phosmet (12.8%) and cyproconazole (11.3%) in honey (**Table 3**), and 3/ carbendazime (34.4%) and amitraz II (14.8%) in pollen (**Table 4**).

The highest maximum concentrations were obtained in pollen for the fungicides thiophanate-methyl (max = 3674.00 ng/g) and carbendazime (max = 2595.00 ng/g). Thiophanate-methyl (max = 2418.70 ng/g) and the insecticide chlorpyrifos (max = 180.20 ng/g) were also quantified in high concentrations in honeybees, although they were rarely detected (5.7% and 3.5% for thiophanate-methyl and chlorpyrifos, respectively). In honey, the highest concentrations concerned the acaricide amitraz II (max = 116.10 ng/g) and the fungicide carbendazime (max = 87.90 ng/g). Although coumaphos was more frequently found in honey (78% of samples) compared to honeybees (17.8%) and pollen (3.9%), the maximal concentrations did not differ significantly between the three matrices (56.40, 47.30 and 40.40 ng/g).

The neonicotinoid imidacloprid was only detected in 3/141 honey samples (2.1%) and in 1/128 pollen samples (0.8%) but not among the 141 honeybee samples. Pyrethroids were also rarely detected with tau-fluvalinate as the most frequent (7.1% in bees, 5.0% in honey and 3.1% in pollen) followed by cypermethrin (1.4% in bees and 0.7% in honey). In contrast, bifenthrin, cyfluthrin, deltamethrin, esfenvalerate, lambda cyhalothrin, permethrin and tefluthrin were never detected.

Honey was the most contaminated matrix by azole fungicides with 5 different compounds, including cyproconazole that was detected in 11.3% of samples. The azole fungicide concentrations were the highest in pollen and were always higher than the LOQ: three samples were contaminated by flusilazole (51.60, 35.88 and 19.9 ng/g), three by triadimenol (35.70, 35.4 and 34.3 ng/g), and one by cyproconazole (22.30 ng/g).

Coumaphos (17.8% in bees, 78.0% in honey and 3.9% in pollen), triphenylphosphate (24.8% in bees, 2.1% in honey and 9.4% in pollen) and phosmet (2.8% in bees, 12.8% in honey and 7.4% in pollen) were the three main cholinesterase inhibitor insecticides detected. The insecticides carbaryl and chlorpyrifos were rarely found. Carbaryl was detected in 3/141, 9/141 and 10/128 of honeybee, honey and pollen samples, respectively. Chlorpyrifos was detected in 5/141 honeybee samples and in 5/128 pollen samples but the maximum concentrations were very high (180.20 ng/g and 139.50 ng/g in honeybee and pollen samples, respectively). Other carbamate and organophosphorus compounds, such as carbofuran, diazinon, dimethoate, fenoxycarb and phoxim, were never or rarely detected.

Contamination according to the landscape context and to the sampling period

Figure 2 shows the mean number of agricultural and veterinary residues (all matrices confounded) detected according to the landscape context. Apiaries in rural-cultivated landscapes seemed to be more contaminated (significant Student test, $\alpha = 5\%$) than apiaries in rural-grassland landscapes (cultivated/grassland landscapes, $p\text{-value} = 2.649.10^{-6}$), in urban landscapes (cultivated/urban landscapes, $p\text{-value} = 5.839.10^{-7}$) and in island landscapes (cultivated/island landscapes, $p\text{-value} = 1.958.10^{-9}$).

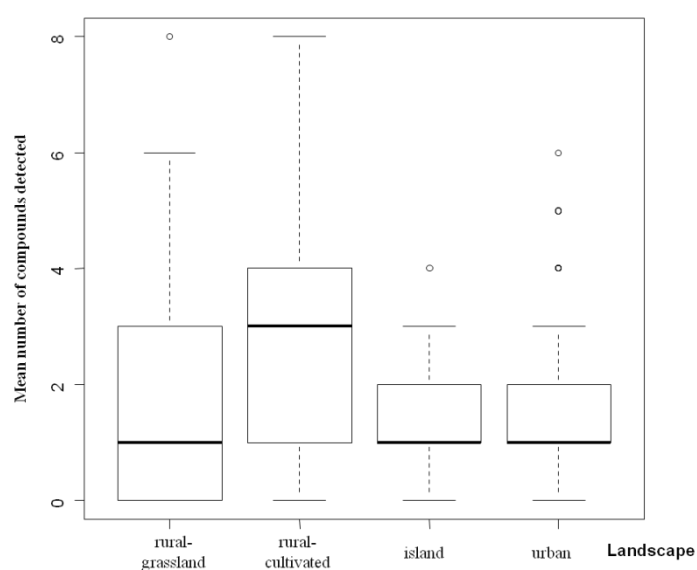


Figure 2. Mean number of compounds detected according to the landscape context. The mean number of compounds was calculated irrespective of matrix (honeybees, honey and pollen) for each landscape context (rural-grassland, rural-cultivated, island and urban landscapes).

Figure 3 shows the mean number of agricultural and veterinary residues (three matrices confounded) detected during 8 periods over 2008 and 2009. Contamination was higher during period 1 (late April-early May 2008) than during all others (significant Student test, $\alpha = 5\%$).

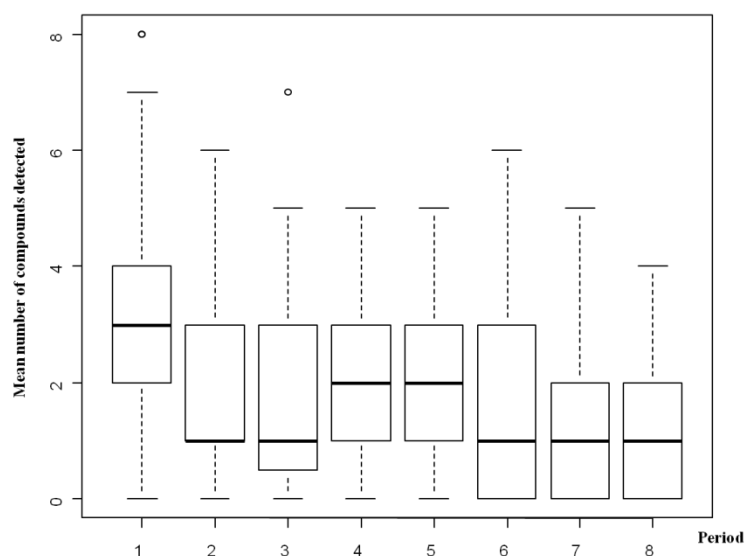


Figure 3. Mean number of compounds detected according to the period. The mean number of compounds was calculated irrespective of matrix (honeybees, honey and pollen) for each period: late April-early May 2008 (period 1) and 2009 (period 5), late June-early July 2008 (period 2) and 2009 (period 6), late July-early August 2008 (period 3) and 2009 (period 7), late September-early October 2008 (period 4) and 2009 (period 8).

Discussion

Pesticide and veterinary drug contamination of beehive matrices

Honey appeared to be the most contaminated matrix in the present study when taking into account the number of residues found by matrix and by sample. This is not in agreement with the results of other investigations into which pollen was found to be the most contaminated matrix [27–28]. Indeed, Mullin et al. [27] showed that, among 140 honeybee and 350 pollen samples collected in the USA, in both 2007 and 2008, 91.4% and 99.1% samples were contaminated, respectively. However, the context of their study and the method used for pesticide detection and quantification were different: (i), samples were collected in order to investigate possible threats to colony health for the CCD (Colony Collapse Disorder) working group, (ii), more than twice as many compounds were searched with an average of 171 pesticides and toxic metabolites studied per analysis, and (iii), honey matrix was not

analyzed for pesticide presence. Another recently published study from beehive matrices collected in France between 2002 and 2005 also showed that pollen samples were the most contaminated (69.5%) compared to honeybee (44.3%) and honey (43.1%) samples [28]. Such contamination differences might be explained because LOD and LOQ were generally higher in pollen than in honeybee or honey matrices in our survey. For most compounds, the maximum concentration and the mean concentration were higher in pollen than in honeybees and honey. If lower LOD and LOQ could be obtained for pollen samples, it is likely that pollen would be the best matrix for assessing the presence of pesticides in foraging area.

Main contaminants in beehive matrices

The fungicide carbendazime and the acaricides amitraz and coumaphos commonly used in beehives to control the parasitic mite *Varroa destructor* were the three main detected residues. Several other studies previously demonstrated that the chemicals used by beekeepers inside the hives are frequently found in the apicultural matrices [27,32–34]. Amitraz residues (amitraz I and amitraz II) were mainly detected in bees at the beginning of autumn (periods 4 and 8) corresponding to periods of treatments against *Varroa destructor*. In the pollen matrix, this acaricide was found during periods 1, 4, 5 and 8 corresponding to the end of the beekeeping season with anti-*Varroa* treatments and the beginning of the next beekeeping season. Surprisingly, amitraz residues were identified in honey samples for all the eight periods. In contrast, Maver and Poklukar [35] and Martel et al. [36] did not detect any residue of amitraz in honey after a treatment with this compound. Coumaphos, another acaricide extensively used against *Varroa* over the last decades, was also frequently detected in apicultural matrices [25,27]. In addition, many studies indicated that coumaphos was persistent in wax and diffused from wax to honey in high proportions [37–38]. Although this acaricide is now banned in France, we detected this molecule in most honey samples (110/141 samples). This might result from past chronic use, accumulation and then transfer from contaminated wax, except for one apiary, where an illegal use of coumaphos was demonstrated after investigations.

The high prevalence of the fungicide carbendazime in the three beehive matrices might result from its very wide use on orchards, vineyard, grain, oleaginous and vegetable crops, both in agricultural and in gardening treatments. Otherwise, carbendazime is also a metabolite of thiophanate-methyl and some detection might be linked to the field use of

thiophanate methyl. This is probably the reason why all samples contaminated by thiophanate-methyl also contained carbendazime residues.

Among the five most frequent residues, Mullin et al. [27] identified the two in-hive miticides, coumaphos and amitraz, and the fungicide chlorothalonil, widely applied for the control of fungal diseases in agricultural and gardening treatments [39]. These results were consistent with those of the present study, even if the fungicide was not the same, probably due to different agricultural treatment practices. The acaricide fluvalinate, which was the most frequent residue found by Mullin et al. [27], was detected in lower frequency in the present study and in a recent French study [28], reflecting different apicultural practices in Europe and North America. Systematic combination between acaricides used to fight *Varroa* and fungicides or other pesticides was reported in many studies [27,40] and the interaction between such compounds may impair honeybee physiological functions [41–43].

Other contaminants and implications for bee colony health

Systemic insecticides including neonicotinoids have been demonstrated to affect honeybee health [44–45]. A survey in France from 2002 to 2005 indicated that imidacloprid was frequently detected in honeybee matrices: 11.2%, 40.5% and 21.8% of honeybee, pollen and honey samples were found to be contaminated, respectively [28]. In contrast, this molecule was rarely detected in our study. A potential explanation is that our data concerned a more recent field study and might reflect changes in agricultural practices, imidacloprid being gradually substituted by thiamethoxam. However this new neonicotinoid was never detected in the present samples. The low presence of neonicotinoids in our samples, probably linked to the multi-residue analysis, might be considered very carefully as these compounds are known to present a high acute and chronic toxicity in bees [14,46–47]. A recent study also indicated that a sublethal exposure to thiamethoxam may increase colony demise through homing failure in foraging bees [48].

Like neonicotinoids, pyrethroids can induce adverse acute sublethal effects in bees [14]. However, except tau-fluvalinate and cypermethrin, other pyrethroids were never detected in our study. These contamination levels were consistent with those of Chauzat et al. [28] but were much lower than those of Mullin et al. [27]. Besides, it has been demonstrated that a synergistic action between pyrethroids and azole fungicides can occur [49] and may

increase the risk for bees. Interestingly, one apiary located in a rural-cultivated landscape, showed pyrethroid (tau-fluvalinate) and azole fungicide (flusilazole) contamination in a same period and both in pollen and bee matrices. An important bee mortality was noticed in this apiary during and after the sampling but no direct relationship with the co-contamination by tau-fluvalinate and flusilazole was demonstrated.

Carbaryl was frequently detected in pollen and honey samples. Ninety percent of carbaryl detections concerned the samples collected in 2008 which is consistent with the ban on use of this compound in November 2008 in France, and confirmed that the beehive matrices are very sensitive to reflect agricultural practices and pesticide uses. In addition, it was previously demonstrated that sublethal exposure to carbaryl had adverse effects on longevity and foraging activities of honeybees [50]. Although the concentrations determined in the present study were lower than those in this semi-field study, a chronic exposure to this insecticide might cause serious problems to bee colonies.

Except coumaphos, phosmet and triphenylphosphate, few organophosphorus compounds were found contrary to other studies. For example, Ghini et al. [51] showed that twelve organophosphorus compounds were present in more than 10% of the samples (58% for malathion and 53% for fenitrothion). The adverse effects of these compounds have been demonstrated and their use is now controlled and limited. When considering the weight of one bee of 0.1108 g (mean weight determined for the sampled honeybees in the present study), some maximum concentrations in honeybees were higher than the LD₅₀ (lethal dose 50) divided by a safety factor of 200: this is the case for the insecticides chlorpyrifos (LD₅₀ = 122 ng/bee, maximum concentration determined = 19.97 ng/bee) and phosmet (LD₅₀ = 803 ng/bee, maximum concentration determined = 6.89 ng/bee). Such concentration levels might have affected the bee health in the corresponding samples either by direct mortality or by sublethal effects on bee physiology and behavior [52]. The maximum concentrations in pollen were similar to those measured in bees for chlorpyrifos and phosmet, and sublethal effects of the residues in bees, especially in brood, were highly likely through consumption of those contaminated pollen samples. Concerning the triphenylphosphate, this organophosphorus is not allowed in agricultural practices in France but is highly used in industrial activities as a flame retardant. So, this ubiquitous environmental pollutant might contaminate apicultural matrices via atmospheric residues. Honeybees are more likely exposed to atmospheric pollutants during their foraging, their flight with their hairy bodies and their ability to hold residues, which might explain the contamination levels found in the present study.

For most residues, no correlation was found between the three beehive matrices collected in a same apiary and at a same period: a residue found in one matrix was not systematically present in the two others. Such differences might be linked to 1/ the sampling methodology at one single time point (honey was stored inside the hive since several days before the sampling, pollen was collected from pollen trap set up 3 days before the sampling, and foraging honeybees were directly removed on the hive's flight board), 2/ the specific biotransformations of residues in each matrix, and so 3/ the ability of each matrix to reflect contamination in time.

Contamination according to the landscape context and to the sampling period

The spatial patterns were previously studied on the contamination of beehive matrices by environmental pollutants like polycyclic aromatic hydrocarbons or heavy metals [23,29–30,53–55]. Most of these studies compared the contamination in both urban and wilder sites. To our knowledge, the pesticide spatial distribution in bees, honey or pollen was only studied in different areas within a same landscape context and especially cultivated landscapes [25–26,28,51]. The present study is the first to monitor beehive matrices contamination by pesticides in 4 different landscape structures characterized by different pesticide and veterinary drug use patterns (private or professional uses, veterinary, apicultural or agricultural uses). Apiaries in rural-cultivated landscapes were more contaminated than apiaries in all other landscape types. The acaricide residues were found in all the 18 apiaries and the differences in spatial distribution were linked to the nature of the compounds used in agricultural treatments such as organophosphorus and carbamate insecticides, and azole fungicides. In rural-cultivated landscapes (dominated by permanent, oleaginous, grain crops, market gardening), agricultural treatments were done on large plots and often on melliferous plants (*Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*); they were more susceptible to contaminate honeybees than local treatments in urban context, particularly if the urban district green services practice the 0 pesticide policy. Despite this trend, the present results showed that some apiaries located in urban landscape, supposed less exposed to pesticide pressure, were more contaminated than apiaries from rural landscapes.

Previous studies showed seasonal variation in beehive matrix contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons [30] or by heavy metals [23,29,54]. Contamination levels were linked to the meteorological conditions and were generally higher during the dry

months. However, few studies reported the evolution of pesticide contamination throughout the beekeeping season. In the present study, the most contaminated period corresponded to late April-early May in 2008 and was associated with agricultural uses and crop treatments [56] and with a high foraging activity. Ghini et al. [51] showed that the maximum level and frequency of pesticides (organophosphate and carbamate residues) occurred in the late spring (May and June). Samplings of the present study were collected 4 times per year and reflected a single time point and not a contamination kinetic all over the year. This sampling methodology might explain such differences with Ghini et al. [51] who realized samplings each month from April to October 2000. The higher contamination in spring 2008 was not found in 2009, probably due to differences in meteorological conditions and treatment time.

In conclusion, our field study revealed the widespread occurrence of multiple residues in honey, honeybees and pollen with different distribution patterns according to the landscape context and the sampling period. This contamination by multiple residues also raises the problem of the impact of combinations of those pesticides and veterinary drugs and their potential synergistic effects on bee and other pollinator health.

Acknowledgments

We thank all the beekeepers who allowed samplings in their colonies and their apiaries. We also thank Allard J-M, Bastian S, and Pouleur B for their help in field sampling.

References

1. McLaughlin A, Mineau P (1995) The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agric Ecosys Environ* 55: 201–212.
2. Reidsma P, Tekelenburg T, van den Berg M, Alkemade R (2006) Impacts of land-use change on biodiversity: an assessment of agricultural biodiversity in the European Union. *Agric Ecosys Environ* 114: 86–102.
3. McKinney ML (2008) Effects of urbanization on species richness: a review of plants and animals. *Urban Ecosys* 11: 161–176.

4. Stoate C, Bãldi A, Beja P, Boatman ND, Herzon I, van Doorn A, de Snoo GR, Rakosy L, Ramwell C (2009) Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe – A review. *J Environ Manag* 91: 22–46.
5. Butler SJ, Boccaccio L, Gregory RD, Vorisek P, Norris K (2010) Quantifying the impact of land-use change to European farmland bird populations. *Agric Ecosys Environ* 137: 348–357.
6. Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Infect Dis* 5: 735–748.
7. Crowl TA, Crist TO, Parmenter RR, Belovsky G, Lugo AE (2008) The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Front Ecol Environ* 6: 238–246.
8. Hejda M, Pyšek P, Jarošík V (2009) Impact of invasive plants on the species richness, diversity and composition of invaded communities. *J Ecol* 97: 393–403.
9. Kenis M, Auger-Rozenberg M-AA, Roques A, Timms L, Péré C, Cock MJW, Settele J, Augustin S, Lopez-Vaamonde C (2009) Ecological effects of invasive alien insects. *Biol Invas* 11: 21–45.
10. Jaffé R, Dietemann V, Allsopp MH, Costa C, Crewe RM, Dall’Olio R, de la Rúa P, El-Niweiri MAA, Fries I, Kezic N, Meusel MS, Paxton RJ, Shaibi T, Stolle E, Moritz RFA (2010) Estimating the density of honey bee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conserv Biol* 24: 583–593.
11. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103: S96–S119.
12. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemis. *Apidologie* 41: 375–392.
13. Core A, Runckel C, Ivers J, Quock C, Siapno T, DeNault S, Brown B, DeRisi J, Smith CD, Hafernik J (2012) A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*. *PLoS ONE* 7: e29639.
14. Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43: 348–370.
15. Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchian S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* 12: 774–782.

16. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet J-L, Texier C, Biron DG, Blot N, Alaoui E, Belzunces LP, Delbac F (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. PLoS ONE 6: e21550.
17. Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. Scientific Reports 2 (326): 1–7.
18. Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. Naturwissenschaften 99: 153–158.
19. Wu JY, Smart MD, Anelli CM, Sheppard WS (2012) Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. J Invertebr Pathol 109: 326–329.
20. Celli G, Maccagnani 2003 Honey bees as bioindicators of environmental pollution. Bull Insectol 56: 137–139.
21. Porrini C, Sabatini AG, Girotti S, Ghini S, Medrzycki P, Grillenzoni F, Bortolotti L, Gattavecchia E, Celli G (2003) Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. Apiacta 38: 63–70.
22. Kalbande DM, Dhadse SN, Chaudhari PR, Wate SR (2008) Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. Environ Monit Assess 138: 233–238.
23. Perugini M, Manera M, Grotta L, Abete MC, Tarasco R, Amorena M (2011) Heavy metals (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. Biol Trace Elem Res 140: 170–176.
24. Perugini M, Di Serafino G, Giacomelli A, Medrzyck P, Sabatini AG, Persano Oddo L, Marinelli E, Amorena M (2009) Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves. J Agric Food and Chem 57: 7440–7444.
25. Balayiannis G, Balayiannis P (2008) Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. Arch Environ Contam Toxicol 55: 462–470.
26. Barmaz S, Potts SG, Vighi M (2010) A novel method for assessing risks to pollinators from plant protection products using honeybees as a model species. Ecotoxicology 19: 1347–1359.

27. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5: e9754.
28. Chauzat M-P, Martel A-C, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P, Faucon J-P (2011) An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ Toxicol Chem* 30: 103–111.
29. Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, Larhantec M, Delbac F, Pouliquen H (2012a) Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environ Pollut* 170: 254–259.
30. Lambert O, Veyrand B, Durand S, Marchand P, Le Bizec B, Piroux M, Puyo S, Thorin C, Delbac F, Pouliquen H (2012b) Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 86: 98–104.
31. Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta C, Amic S, Lambert O, Pouliquen H, Arnaudguilhem C (2011) Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1218: 5743–5756.
32. Lodesani M, Costa C, Bigliardi M, Colombo R (2003) Acaricide residues in bee wax and organic beekeeping. *Apiacta* 38: 31–33.
33. Sabatini AG, Carpana E, Serra G, Colombo R (2003) Presence of acaricides and antibiotics in samples of Italian honey. *Apiacta* 38: 46–49.
34. Tsigouri A, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasyvoulou A, Diamantidis G (2003) Fluvalinate residues in Greek honey and beeswax. *Apiacta* 38: 50–53.
35. Maver L, Poklukar J (2003) Coumaphos and amitraz residues in Slovenian honey. *Apiacta* 38: 54–57.
36. Martel A-C, Zeggane S, Aurière C, Drajnudel P, Faucon J-P, Aubert M (2007) Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® and Asuntol®50. *Apidologie* 38: 534–544.
37. Van Buren NWM, Mariën J, Velthuis HHW, Oudejans RCHM (1992) Residues in beeswax and honey of perizin, an acaricide to combat the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Mesostigmata). *Environ Entomol* 21: 860–865.
38. Wallner K (1999) Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30: 235-248

39. Chaves A, Shea D, Danehower D (2008) Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. *Chemosphere* 71: 629–638.
40. Orantes-Bermejo FJ, Pajuelo AG, Megias MM, Fernández-Piñar CT (2010) Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *J Apic Res* 48: 243–250.
41. Meled M, Thrasyvoulou A, Belzunces LP (1998) Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environ Toxicol Chem* 17: 2517–2520.
42. Thompson H, Wilkins S (2003) Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bull Insectol* 56: 131–134.
43. Johnson RM (2011) Managed pollinator coordinated agricultural project – miticide and fungicide interactions. *Am Bee J* 151: 975–978.
44. El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 82: 30–39.
45. El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C (2008) Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch Environ Contam Toxicol* 54: 653–661.
46. Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delègue M-H (2004a) Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybees (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 78: 83–92.
47. Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M-H (2004b) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57: 410–419.
48. Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Scienceexpress* 10.1126, science.1215039, 4p.
49. Pilling ED, Bromley-Challenor KAC, Walker CH, Jepson PC (1995) Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 51: 1–11.
50. MacKenzie KE, Winston ML (1989) The effects of sublethal exposure to diazinon, carbaryl and resmethrin on longevity and foraging in *Apis mellifera* L. *Apidology* 20: 29–40.

51. Ghini S, Fernández M, Picó Y, Marín R, Fini F, Mañes J, Girotti S (2004) Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Arch Environ Contam Toxicol* 47: 479–488.
52. Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 57: 81–106.
53. Tuzen M, Silici S, Mendil D, Soylak M (2007) Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chem* 103: 325–330.
54. Morgano MA, Teixeira Martins MC, Rabonato LC, Milani RF, Yotsuyanagi K, Rodriguez-Amay B (2010) Inorganic contaminants in bee pollen from Southeastern Brazil. *J Agric Food and Chem* 58: 6876–6883.
55. Bilandžić N, Đokić M, Sedak M, Kolanović BS, Varenina I, Končurat A, Rudan N (2011) Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chem* 128: 1160–1164.
56. Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K (2012) Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7: e29268.

4.4. Analyses statistiques complémentaires de données de contamination par les résidus des traitements agricoles et vétérinaires dans les matrices apicoles

Cette partie a pour objectif principal de renforcer l'interprétation des résultats développés dans la partie précédente 4.3. (Lambert *et al.*, soumis) à l'aide de méthodes d'analyses statistiques descriptives et multivariées, notamment de mettre en évidence les molécules les plus fréquemment détectées et/ou quantifiées, les groupes de ruchers les plus contaminés et le lien avec le paysage et/ou la période de prélèvement (Annexe 2). L'ensemble des analyses a été effectué avec le logiciel R (R Development Core Team, 2010) et le package FactoMineR (Lê *et al.*, 2008). Cette partie fera l'objet d'une valorisation scientifique sous forme d'un article dès que possible.

4.4.1. Résultats toxicologiques et jeu de données

En toxicologie environnementale, il est fréquent qu'un certain nombre de résidus recherchés ne soient ni détectés ni quantifiés dans tous les échantillons. Bien qu'il soit d'usage d'attribuer une valeur de $\frac{1}{2}$ LOD pour les résidus non détectés et une valeur de $\frac{1}{2}$ LOQ pour les résidus détectés et non quantifiés, et que certains auteurs proposent des méthodes statistiques de substitution des valeurs non quantifiées (Aruga, 1997 ; Field, 2011), ces méthodes ne sont pas applicables pour nos résultats étant donné le très grand nombre de valeurs non quantifiées. En effet, parmi :

- les 141 échantillons d'abeilles, 39 ne semblent pas contaminés, 20 molécules différentes sur les 80 recherchées sont détectées et/ou quantifiées et 32 résidus sur les 196 détections et/ou quantifications sont quantifiés ;

- les 141 échantillons de miel, 6 ne semblent pas contaminés, 28 molécules différentes sur les 80 recherchées sont détectées et/ou quantifiées et 108 résidus sur les 412 détections et/ou quantifications sont quantifiés ;
- les 128 échantillons de pollen, 53 ne semblent pas contaminés, 23 molécules différentes sur les 80 recherchées sont détectées et/ou quantifiées et 56 résidus sur les 143 détections et/ou quantifications sont quantifiés.

La transformation de ces données quantitatives en données qualitatives est donc nécessaire. Les données sont ainsi transformées en variables binaires « présence » (1 = molécule détectée et/ou quantifiée) ou « absence » (0 = molécule non détectée) pour chaque molécule, information essentielle et suffisante dans la perspective d'utilisation des matrices apicoles comme sentinelles de la contamination de l'environnement. En parallèle de ces données sur la présence ou l'absence de la molécule dans les échantillons, trois variables qualitatives supplémentaires sont prises en considération dans le jeu de données des résultats toxicologiques : la matrice, le paysage et la période d'échantillonnage.

4.4.2. Classifications hiérarchiques sur les données initiales

La méthode utilisée ici est le croisement de deux classifications ascendantes hiérarchiques (CAH), l'une réalisée sur les pesticides et médicaments vétérinaires, l'autre sur les ruchers, afin de mettre en évidence un lien éventuel entre ces deux variables et de regrouper les ruchers aux profils de contamination similaires. La représentation graphique pour chaque matrice étudiée, fournit une carte de carrés gris et noirs relatifs respectivement à l'absence et la présence de la molécule (ligne) sur le rucher correspondant (colonne) (Figures 24, 25 et 26). Ces graphiques sont produits par le package `heatmaps.plus` (Allen Day, 2007-09-05, version 1.3) du logiciel R.

Dans les échantillons de la matrice abeilles, un groupe de sept molécules est plus fréquemment retrouvé (Figure 24) : l'amitrazé II, l'amitrazé I, le thiophanate-méthyl, le tau-fluvalinate, le coumaphos, le carbendazime et le triphénylphosphate. L'arbre de la CAH ne permet pas d'identifier des groupes de ruchers : on observe cependant que, (i) six ruchers (N, J, I, D, G et L) sont contaminés par ce groupe de sept molécules et plus de deux autres molécules, (ii) dix ruchers (F, B, P, C, M, O, E, H, IO et IY) sont contaminés par ce groupe et une ou deux autres molécules, et (iii) deux ruchers (K et A) ne sont contaminés par aucune autre molécule.

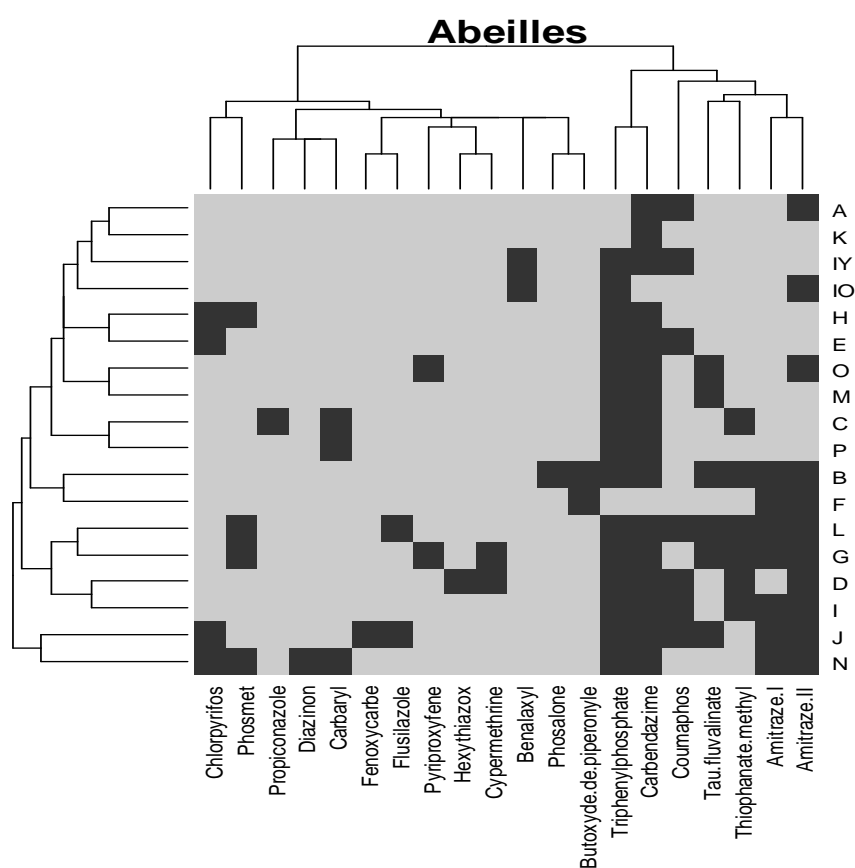


Figure 24. Représentation graphique des profils de contamination des échantillons d'abeilles par le croisement des classifications hiérarchiques ascendantes sur les variables pesticides et médicaments vétérinaires (en abscisses) et ruchers (en ordonnées). Les carrés gris correspondent à l'absence de la molécule dans le rucher (molécule non détectée); les carrés noirs correspondent à la présence de la molécule (molécule détectée et/ou quantifiée).

Dans les échantillons de la matrice miel (Figure 25), un groupe de six molécules, identifié par la CAH, est présent majoritairement : le carbendazime, l'amitraze II, le coumaphos, le phosmet, le butoxyde de piperonyl et l'imazalil. L'arbre de la CAH ne permet pas une classification performante des ruchers. Huit ruchers (A, J, G, B, L, O, D et E) sont contaminés par plus de quatre molécules supplémentaires, huit autres ruchers (K, M, N, IO, F, I, P et IY) sont contaminés par une ou deux molécules supplémentaires et seuls deux ruchers ne montrent aucune contamination supplémentaire. Contrairement à la matrice abeille, cette logique de contamination n'apparaît pas dans l'arbre de la CAH des ruchers.

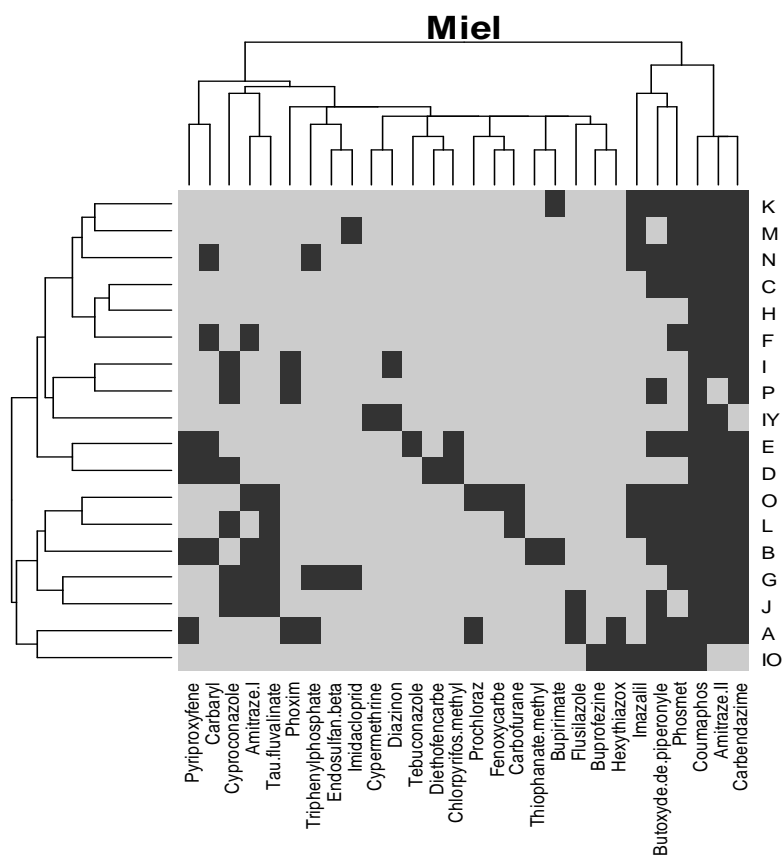


Figure 25. Représentation graphique des profils de contamination des échantillons de miel par le croisement des classifications hiérarchiques ascendantes sur les variables pesticides et médicaments vétérinaires (en abscisses) et ruchers (en ordonnées). Les carrés gris correspondent à l'absence de la molécule dans le rucher (molécule non détectée); les carrés noirs correspondent à la présence de la molécule (molécule détectée et/ou quantifiée).

Dans la matrice pollen (Figure 26), la CAH identifie deux groupes, un groupe de 4 molécules (carbendazime, carbaryl, triphénylphosphate et amitraze II) présentes dans une grande majorité des ruchers et un groupe des autres molécules peu fréquentes. La CAH ne met pas en évidence de groupes de ruchers particuliers bien que le rucher J soit clairement plus contaminé que les autres ruchers. Cette tendance nette n'est pas marquée dans les matrices abeilles et miel même si ce rucher de cultures est toujours identifié parmi les ruchers les plus contaminés.

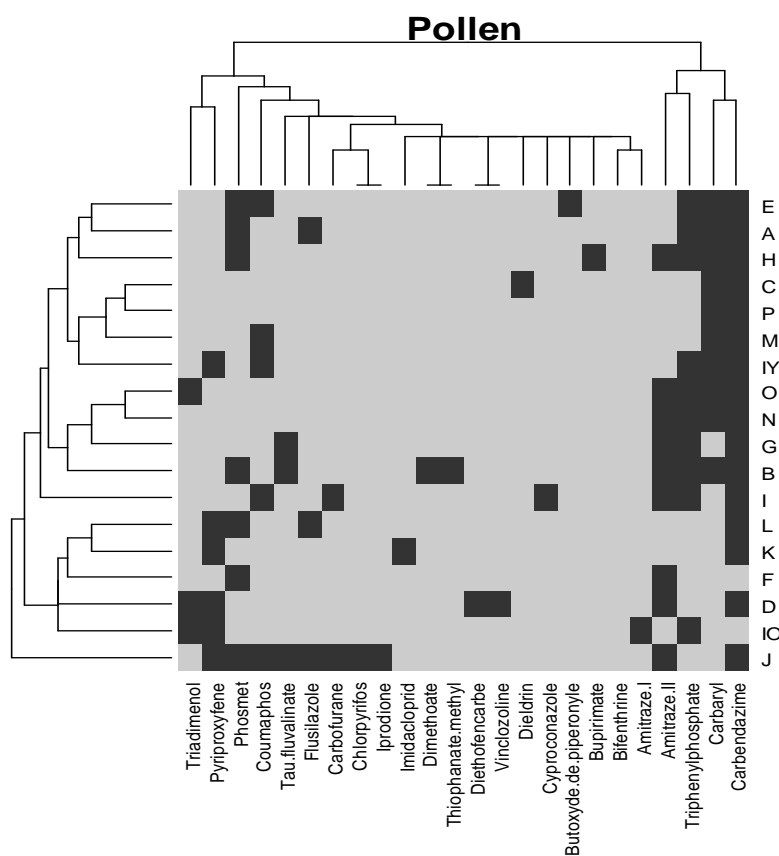


Figure 26. Représentation graphique des profils de contamination des échantillons de pollen par le croisement des classifications hiérarchiques ascendantes sur les variables pesticides et médicaments vétérinaires (en abscisses) et ruchers (en ordonnées). Les carrés gris correspondent à l'absence de la molécule dans le rucher (molécule non détectée); les carrés noirs correspondent à la présence de la molécule (molécule détectée et/ou quantifiée).

En résumé, les classifications ascendantes hiérarchiques illustrent les résultats trouvés précédemment avec des molécules communes à toutes les matrices apicoles et une contamination plus importante par le carbendazime, le coumaphos et l'amitrazé II. Ces analyses graphiques soulignent également la sensibilité différente de chaque matrice et des profils de contamination spécifiques pour la plupart des ruchers suivis. Un rucher (J) en particulier, et deux autres (G et L) dans une moindre mesure, semblent néanmoins plus contaminés, ces ruchers correspondant à des ruchers de paysage cultures.

4.4.3. Description des profils de contamination dans la matrice miel

L'analyse descriptive détaillée dans l'article ([Lambert et al., soumis](#)) a mis en évidence une contamination plus importante des échantillons de miel (95,7 % des échantillons contaminés) par rapport aux deux autres matrices. De plus, les méthodes factorielles sur des données qualitatives sont sensibles aux modalités rares qui peuvent influencer fortement les analyses et masquer ainsi les tendances générales. Pour ces raisons, seules les molécules détectées dans la matrice miel et dans plus de 3 % des échantillons sont retenues pour les analyses factorielles ([Lambert et al., soumis, Tableau 3](#)) : amitrazé I, amitrazé II, carbaryl, carbendazime, coumaphos, cyproconazole, imazalil, phosmet, butoxyde de pipéronyl, pyriproxifène et tau-fluvalinate.

L'objectif est d'évaluer la cohérence entre, d'une part la structure de répartition des molécules dans les échantillons de miel, d'autre part les types de paysages, les ruchers et les périodes de prélèvements. Pour y répondre, une Analyse des Correspondances Multiples (ACM) est réalisée, les pesticides et médicaments vétérinaires étant introduits comme variables actives et les ruchers, paysages et périodes comme variables supplémentaires ([Figures 27 et 28](#)).

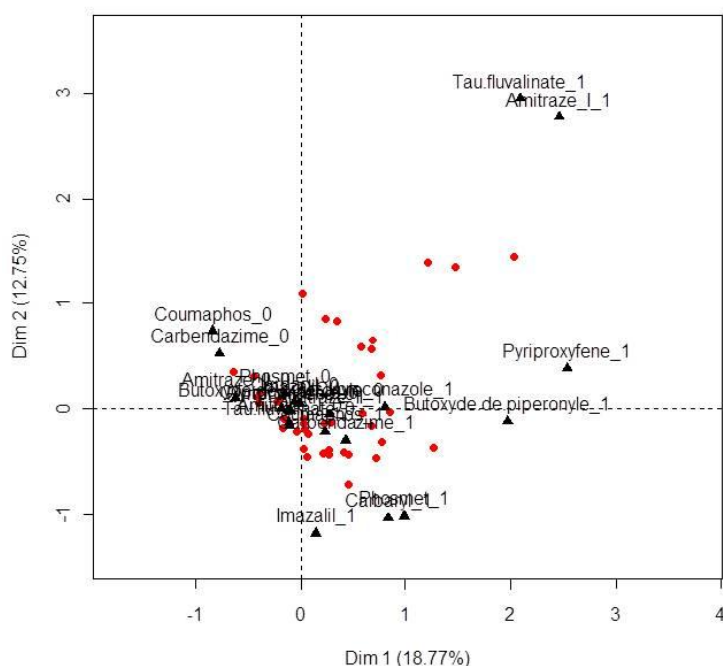


Figure 27. Premier plan factoriel de l'Analyse des Correspondances Multiples sur les échantillons de miel. Représentation des variables actives (molécules). Les échantillons sont représentés par les points rouges.

L'axe 1 s'interprète comme un axe de contamination, opposant des échantillons contenant plusieurs résidus avec de fortes coordonnées positives à des échantillons pauvres en résidus avec de faibles coordonnées négatives. Certains résidus plutôt rares (amitraze I, pyriproxifène, tau-fluvalinate) contribuent fortement à la construction de l'axe car ils sont détectés et/ou quantifiés dans les mêmes échantillons. La modalité supplémentaire « paysage de type cultures », les ruchers B et J, et la période 1 sont significativement à droite de l'axe 1 et donc associés à une contamination plus élevée. A l'opposé, la modalité « paysage de type insulaire » et les ruchers IO et IY sont dans la partie gauche de l'axe et donc associés à l'absence de résidus dans les échantillons (également pour les molécules majoritaires, comme le mettent en évidence les modalités « coumaphos_0 » et « carbendazime_0 », présentes à gauche).

La partie supérieure de l'axe 2 est associée à la présence des insecticides/acaricides tau-fluvalinate et amitraze I, et du rucher O. La partie inférieure est quant à elle caractérisée par la présence des insecticides imazalil, phosmet et carbaryl, et les modalités supplémentaires rucher D et période 2. L'association de ces molécules est difficilement explicable, ce qui rend l'interprétation de cet axe particulièrement délicate.

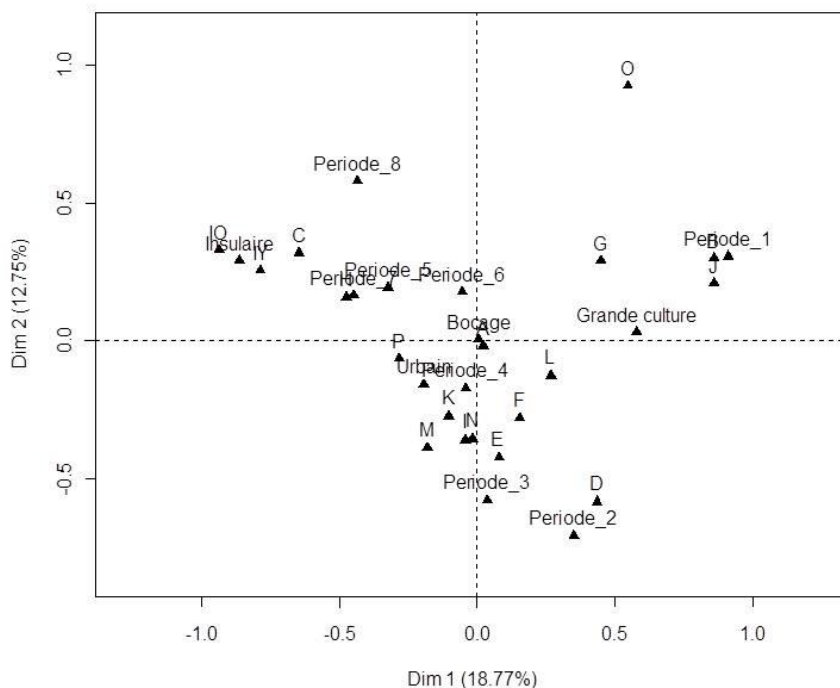


Figure 28. Premier plan factoriel de l'Analyse des Correspondances Multiples sur les échantillons de miel. Représentation des variables supplémentaires (rucher, paysage, période).

Une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) est réalisée sur les échantillons de miel après l'ACM, et permet de classer les variables supplémentaires ayant un comportement similaire (clusters). Les résultats mathématiques de la CAH permettent le regroupement des clusters en 3 classes : la classe 1 correspondant au cluster 1, la classe 2 correspondant au cluster 7 et la classe 3 correspondant aux clusters 2, 3, 4, 5 et 6 (Figure 29, Tableau 16).

La classe 1 contient 35 échantillons caractérisés par leur faible contamination (modalité 0 ; à gauche de l'axe 1), y compris par l'absence des molécules fréquentes comme le carbendazime, le coumaphos ou l'amitrazé II. Ces échantillons sont associés aux ruchers IO et IY de paysage insulaire. Dans cette classe, la modalité « paysage de type cultures » est sous représentée.

La classe 2 est caractérisée par la présence de deux molécules utilisées en usage apicole dans la lutte contre *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010), le tau-fluvalinate (Apistan®) et l'amitrazé I (premier produit de dégradation de l'amitrazé (Apivar®)). Le rucher O fait partie de cette classe. Les pratiques apicoles dans ce rucher confirment l'utilisation de ces deux molécules en traitements anti-varroa.

La classe 3 contient les clusters intermédiaires difficilement interprétables, et est caractérisée à la fois par la présence des molécules les plus fréquentes et la présence de molécules plus rares.

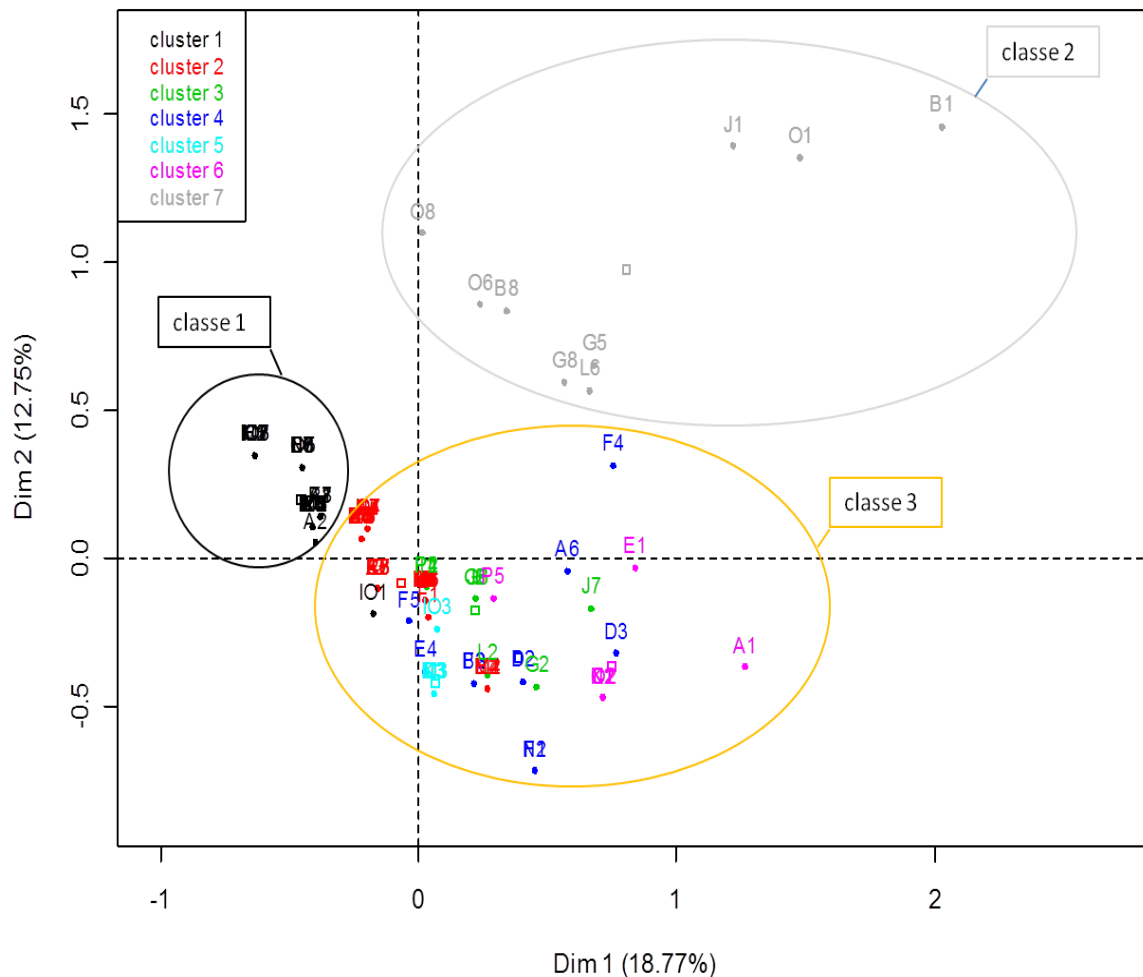


Figure 29. Classification Ascendante Hiérarchique des échantillons de miel (identifiés par une lettre, de A à P correspondant au rucher, et un chiffre de 1 à 8, correspondant à la période ; exemple J1 = rucher 1 période1) en fonction de leurs profils de contamination, et regroupement des clusters par classe.

Tableau 16. Description des classes d'échantillons obtenues à partir de la Classification Ascendante Hiérarchique.

classe	Modalités sur-représentées	Modalités sous-représentées
1 (n=35)	Carbendazime_0, Amitraze_II_0, Coumaphos_0, Cyproconazole_0, (Insulaire, ruchers IO, IY et C)	Cyproconazole_1, Coumaphos_1, Amitraze_II_1, Carbendazime_1, (Culture)
2 (n=61)	Cyproconazole_0, Carbendazime_1, Amitraze II_1, Butoxyde de pipéronyle_0, Tau_fluvalinate_0, Carbaryl_0, (période 4, rucher I)	Carbaryl_1, Cyproconazole_1, Tau-fluvalinate_1, Butoxyde de pipéronyle_1, Amitraze II_0, Carbendazime_0, (rucher IO)
3 (n=12)	Cyproconazole_1, Carbendazime_1, (Culture, ruchers J, P et G)	Carbendazime_0, Cyproconazole_0
4 (n=10)	Carbaryl_1, (rucher F)	Carbaryl_0
5 (n=6)	Imazalil_1, (période 3)	Imazalil_0
6 (n=8)	Butoxyde de pipéronyle_1, Phosmet_1, (période 1)	Butoxyde de pipéronyle_0, Phosmet_0
7 (n=9)	Tau-fluvalinate_1, Amitraze_1, (rucher O, Culture)	Amitraze_0, Tau-fluvalinate_0

4.4.4. Sensibilité des matrices envers les variables paysage et période

L'objectif est de déterminer, d'une part si les modalités des variables supplémentaires « paysage » et « période » sont significativement différentes au sein des matrices miel et abeilles, d'autre part si une matrice est plus discriminante qu'une autre vis-à-vis de ces variables. La matrice pollen n'entre pas dans l'analyse au vu du nombre de données manquantes et de sa plus faible contamination. Comme pour la matrice miel, une Analyse des Correspondances Multiples (ACM) a été réalisée (mais non détaillée dans cette partie ; voir [Annexe 3](#)) pour la matrice abeilles, les pesticides et médicaments vétérinaires étant introduits comme variables actives et les ruchers, paysages et périodes comme variables supplémentaires. Les résultats des ACM miel et abeilles sont utilisés afin d'étudier les projections des modalités des variables « paysage » et « période » (ellipses de confiance) ([Figures 30 et 31](#)). Dans les graphiques des ACM, chaque modalité qualitative supplémentaire est identifiée par un point, le barycentre des individus qui la possèdent. L'ellipse de confiance représente la zone de probabilité à 95 % de ce point. Deux ellipses de confiance qui se chevauchent signifient que les modalités ne sont pas significativement différentes ou qu'elles sont détenues par le même type d'individus.

Dans la matrice miel (Figure 30), les individus de la modalité « insulaire » (points verts) sont peu dispersés et donnent une bonne représentation du barycentre et de l'ellipse de confiance. A l'inverse, les individus de la modalité « urbain » (points rouges) et de la modalité « bocage » (points bleus) sont très dispersés et les ellipses en fournissent alors une représentation médiocre. Les individus de la modalité « grande culture » (points roses) sont plus dispersés que ceux de la modalité « insulaire » mais ils ont tous des ordonnées négatives en opposition avec les individus de la modalité « insulaire » en ordonnées positives. Ainsi les modalités de la variable « paysage » sont plutôt bien discriminées avec une opposition nette entre la modalité « insulaire » et la modalité « grande culture » alors que les ellipses de confiance des modalités « urbain » et « bocage » se recourent. Les individus représentant les différentes périodes sont très dispersés et donnent une image médiocre de chaque modalité ; les ellipses de confiance de chaque période se chevauchent et, bien que la période 1 ait une légère tendance à se distinguer, les différentes périodes ne sont pas distinctement différenciées.

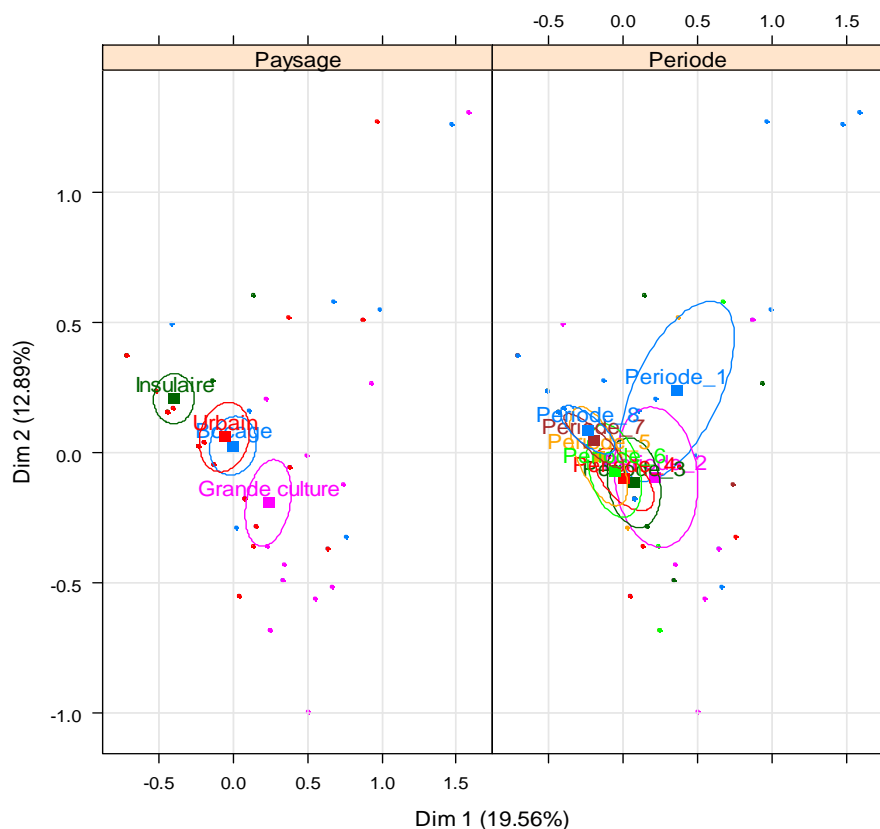


Figure 30. Ellipses de confiance des variables supplémentaires, périodes (de 1 à 8) et paysages (insulaire, urbain, bocage et grande culture) dans la matrice miel. Chaque point représente un échantillon lié à une modalité, chaque carré représente une modalité et chaque ellipse représente la zone de probabilité à 95 % de la modalité.

A l'inverse, dans la matrice abeille (Figure 31), les modalités de la variable « paysage » ne sont pas clairement différenciées (toutes les ellipses se chevauchent) ; par contre les modalités de la variable « période » le sont un peu plus. Toutes les ellipses de confiance des modalités « période » se chevauchent mais elles sont plus écartées que celles des modalités « paysage » ou que celles de l'ACM miel ; une opposition sensible apparaît entre la période 1 et les périodes 4 et 8. Les individus de la période 1 sont tous en ordonnées positives et correspondraient à une période de contamination plus élevée liée à une pression de traitements phytosanitaires plus importante et à un effort de butinage des abeilles plus intense pendant la floraison de nombreux végétaux. Les périodes 4 et 8, qui correspondent aux périodes de traitements acaricides contre *Varroa destructor* (Clément et coll., 2006), sont positionnées en ordonnées négatives avec des ellipses très étirées, fortement influencées par les 3 points du bas du graphique. Ceci explique notamment leurs différenciations par rapport aux autres périodes.

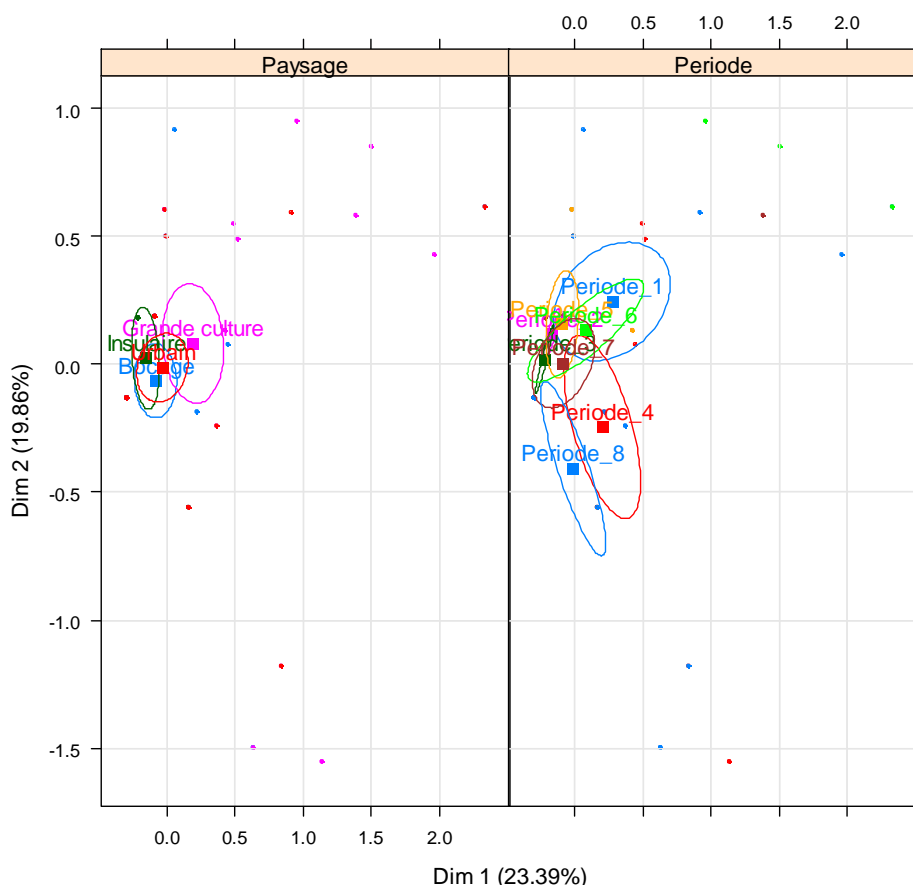


Figure 31. Ellipses de confiance des variables supplémentaires, périodes (de 1 à 8) et paysages (insulaire, urbain, bocage et grande culture) dans la matrice abeille. Chaque point représente un échantillon lié à une modalité, chaque carré représente une modalité et chaque ellipse représente la zone de probabilité à 95 % de la modalité.

Ces résultats montrent une sensibilité différente des matrices apicoles, la variable « paysage » étant mieux discriminée dans la matrice miel et la variable « période » dans la matrice abeilles. Ces différences semblent principalement liées à la représentativité dans le temps de chaque matrice, même si les prélèvements sont ponctuels. Les abeilles butineuses prélevées représentent une image ponctuelle de la contamination environnementale et plus caractéristique d'une période précise qui s'oppose à l'effet mémoire du miel qui, mélangé, stocké et déplacé par les abeilles au sein de la ruche durant la saison apicole, donne une image plus lissée et plus étendue dans le temps de cette contamination environnementale et donc plus caractéristique d'un type paysager.

4.4.5. Bilan des analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées sur les échantillons de la matrice miel et abeilles montrent une sensibilité spécifique aux variables « paysage » et « période » mais de manière générale, opposent les échantillons de paysage insulaire caractérisés par une faible contamination aux échantillons de paysage cultures marqués par une contamination plus élevée. De même, la période 1 (printemps) semble associée aux échantillons les plus contaminés comme ont pu le montrer des études antérieures ([Ghini et al., 2004](#) ; [Chauzat et al., 2006](#)). Les paysages urbain et bocage ne sont significativement associés, ni aux échantillons les moins contaminés, ni aux échantillons les plus contaminés. La matrice abeille reflète directement les pratiques d'utilisation des pesticides et des médicaments vétérinaires et donne une image ponctuelle de la contamination de l'environnement alors que la matrice miel montre un effet mémoire de cette contamination et reflète plus les différences liées aux paysages.

Ces résultats confirment et sont complémentaires des résultats discutés dans la partie précédente. Les méthodes factorielles appliquées ici apportent des informations intéressantes même si la robustesse des analyses et les interprétations sont limitées par le jeu de données caractérisé par une quantité élevée de molécules non détectées ou non quantifiées.

4.5. Comparaison des pratiques d'utilisation des substances à usages phytosanitaires et vétérinaires et de la contamination des matrices apicoles des 18 ruchers de l'étude

4.5.1. Contexte général et objectif

Avec 5,4 kg/ha/an, la France occupe la 3^{ème} place au rang européen de la consommation de pesticides en nombre d'hectares cultivés en 2008 ([Observatoire des Résidus de Pesticides](#)). L'évolution des tonnages annuels français en pesticides utilisés montre une diminution globale depuis le début des années 2000, de près de 100 000 tonnes à plus 78 500 tonnes par an entre 2001 et 2008 ([Figure 32](#)). En 2008, la consommation de pesticides par les jardiniers (collectivités territoriales, particuliers, ...) serait de 8 000 tonnes soit 10 % du tonnage utilisé par le monde agricole ([planetoscope.com](#)).

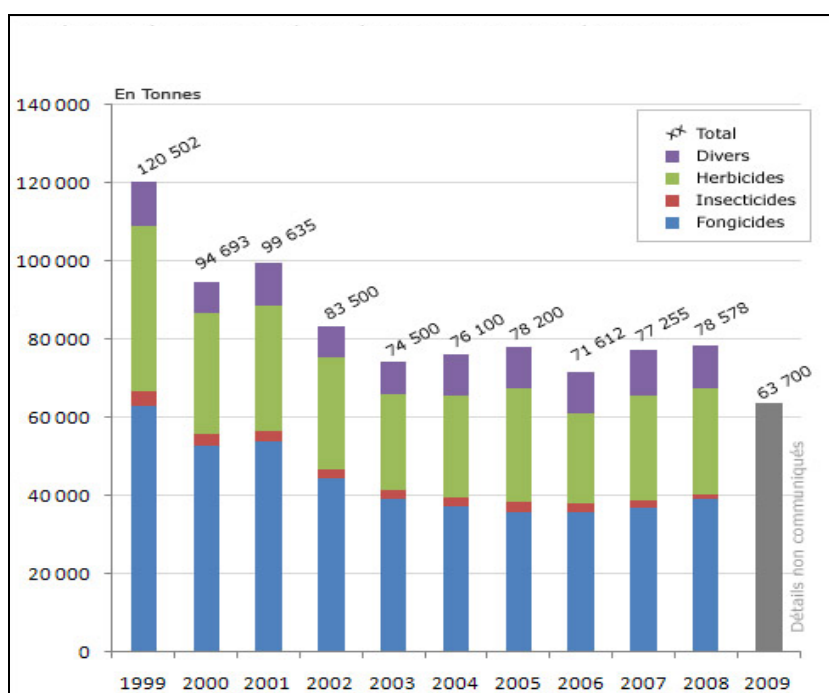


Figure 32. Evolution du tonnage des substances actives phytosanitaires en France de 1999 à 2009 (source IUPP, <http://www.lefigaro.fr>).

Cette tendance à la baisse d'utilisation des pesticides (calculée en tonnage), bien qu'inversée en 2007 et 2008, s'explique notamment par (i) la forte diminution des usages de

soufre et de cuivre (- 40 % ; [Figure 33](#)), (ii) l'interdiction d'usage de molécules appliquées à de fortes quantités par hectare et la réduction des doses appliquées, (iii) l'apparition en parallèle de nouvelles molécules actives à de très faibles doses par hectare, et (iv) les nombreuses mesures mises en œuvre visant à réduire l'usage des pesticides.

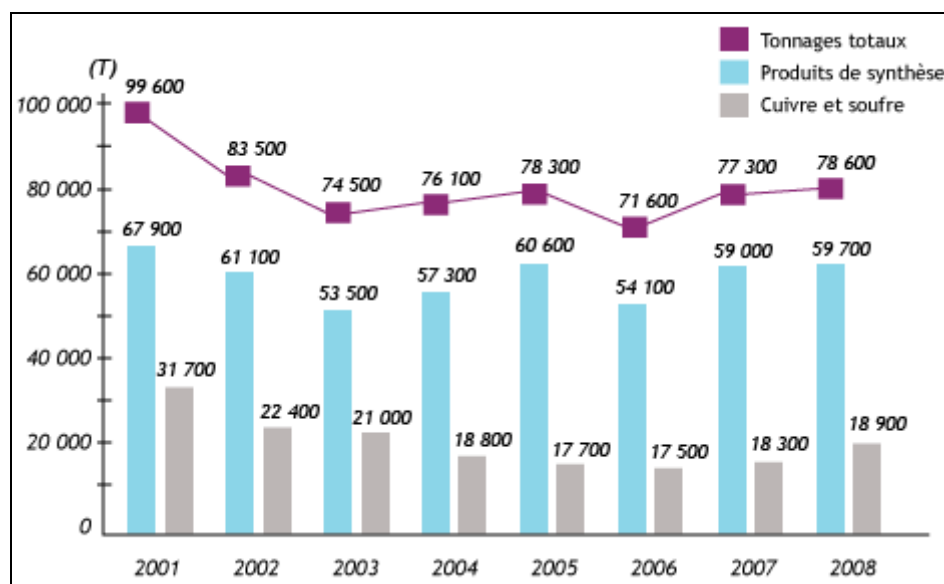


Figure 33. Evolution du tonnage annuel de pesticides utilisés en France entre 2001 et 2008 (source UIPP, [Observatoire des Résidus de Pesticides](#)).

L'augmentation des utilisations en 2007 et 2008 serait quant à elle liée à (i) l'augmentation des surfaces cultivées suite à la remise en cultures de jachères, (ii) des conditions climatiques exceptionnelles entraînant une pression parasitaire importante et (iii) l'augmentation des prix agricoles poussant les agriculteurs à maintenir une pression phytosanitaire élevée pour assurer de bons rendements.

L'année 2008 est marquée par la mise en place du plan Ecophyto 2018, mesure proposée par le Grenelle de l'Environnement visant à réduire et sécuriser l'utilisation des produits phytosanitaires d'usage aussi bien agricole que non-agricole. Les objectifs sont, d'une part de réduire de 50 % l'usage des pesticides à l'horizon 2018 (sans précision sur cette réduction : tonnage, matière active, produits les plus utilisés ou les moins utilisés, ... ?), d'autre part de retirer du marché les préparations contenant les 53 substances actives les plus préoccupantes (dont 30 avant la fin de l'année 2008).

Dans cette problématique complexe de baisse généralisée de l'utilisation des pesticides mais d'utilisation grandissante de molécules efficaces à très faibles doses et sujettes à

polémiques, tels que les insecticides systémiques, la contamination des milieux et des organismes est un fait, notamment objectivé par l'analyse multi-résidus des matrices apicoles réalisée dans le cadre de l'étude (Lambert *et al.*, soumis). La comparaison des molécules retrouvées dans les abeilles, le miel et le pollen et des molécules utilisées sur le terrain peut permettre d'évaluer les transferts non intentionnels des substances à usages phytosanitaires et vétérinaires vers les organismes non cibles. A ce titre, nous avons déterminé les pratiques d'utilisation des substances à usages phytosanitaires et vétérinaires par la réalisation d'enquêtes auprès des utilisateurs du paysage de chaque aire de butinage, qu'ils soient professionnels (exploitants agricoles, entreprises, municipalités, ...) ou particuliers. Il s'agissait bien d'obtenir une image la plus représentative possible des molécules utilisées sur le terrain en 2008 (évaluation de l'exposition) et de la comparer à celle des molécules retrouvées dans les matrices apicoles étudiées. Ce travail d'enquêtes et les résultats obtenus feront l'objet d'une valorisation scientifique sous forme d'un article dès que possible.

4.5.2. Réalisation

Les enquêtes se sont déroulées en deux étapes : 1/ mise en place d'un questionnaire pour récolter les informations de base relatives à l'utilisation des substances à usages phytosanitaires et vétérinaires pour l'année 2008, et 2/ récolte des informations auprès des usagers du paysage.

4.5.2.a. Les questionnaires

Les questionnaires ont été adaptés à chaque catégorie d'interlocuteurs en fonction de leurs pratiques agricoles et de jardinage regroupant, d'une part, les professionnels agricoles (céréaliers, maraîchers, viticulteurs, éleveurs, ...), d'autre part, les structures publiques ou privées (services espaces verts des municipalités, entreprises, ...) et les particuliers. Les questionnaires récapitulent les données relatives (i) aux végétaux traités comme sources de nourriture pour les abeilles (surface couverte par le végétal, surface traitée, espèces traitées, date de mise en culture, date de récolte, ...), (ii) aux produits phytosanitaires et vétérinaires utilisés et sources potentielles de contamination pour les abeilles (nom commercial, dose utilisée, dates d'utilisation, ...).

Les questionnaires à destination des exploitants agricoles ont été construits en se reposant sur l'échelle spatiale de l'îlot PAC par souci de précision et de simplicité. Un îlot PAC est un ensemble de parcelles contiguës exploitées, portant une ou plusieurs cultures, délimité par des éléments permanents facilement repérables (chemins, haies, route, ruisseau) ou par d'autres exploitations, et stable d'une année sur l'autre. Les îlots PAC constituent ainsi un outil de base, notamment pour le travail administratif des exploitants agricoles et plus particulièrement, en lien direct avec l'objet de l'étude, pour la tenue des registres phytosanitaires. Les données des îlots PAC sont par ailleurs géo-référencées au niveau du registre parcellaire graphique de la Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt (DRAAF), accessibles et donc exploitables dans le cadre de notre étude. Le questionnaire récapitule ainsi les données concernant les cultures et les traitements phytosanitaires pour chaque îlot PAC ([Annexe 4](#)).

Le questionnaire pour les éleveurs vise à déterminer les traitements vétérinaires (antiparasitaires notamment) effectués sur les animaux de production mais également les traitements sanitaires sur les matériels et les locaux d'élevage. En effet, de nombreuses études ont montré que des résidus de traitements vétérinaires étaient retrouvés, notamment dans les excréments des animaux traités ou les eaux de ruissellement, et ainsi relargués dans l'environnement impactant la faune des insectes auxiliaires et leurs prédateurs ([Wratten et Forbes, 1996](#) ; [Floate *et al.*, 2005](#) ; [Floate, 2006](#) ; [Suárez *et al.*, 2009](#) ; [Beynon, 2012](#)). Les abeilles peuvent être exposées aux molécules utilisées pour ces traitements lors de leurs activités de récolte d'eau, sachant que leurs préférences vont aux mares et aux purins. De plus, les pratiques apicoles concernant les traitements vétérinaires ont été prises en considération *via* des audits réalisés pour chaque rucher.

Les questionnaires à destination des structures publiques ou privées reprennent les mêmes éléments que les questionnaires pour les exploitants agricoles, à l'échelle plus réduite de la parcelle (plantes traitées, surfaces, dates de traitements, produits utilisés, ...).

4.5.2.b. La récolte des informations.

Afin d'obtenir une image la plus fidèle possible de l'utilisation des pesticides, l'objectif des enquêtes était de couvrir de 50 % à 90 % de la surface totale exploitée de chaque aire de butinage des dix-huit ruchers (limitée à 3 kilomètres de rayon autour du rucher,

soit 2827 hectares). Pour les ruchers de paysage urbain, la surface enquêtée a été considérablement réduite du fait du nombre conséquent de personnes à interroger.

Pour chaque aire de butinage, la liste exhaustive des professionnels agricoles a été établie par recoupement des données du Registre Parcellaire Graphique communiquées par la DRAAF et des informations fournies par chaque mairie. Les agriculteurs et/ou éleveurs ont été informés de l'étude et des objectifs de l'enquête par les Chambres Départementales d'Agriculture et la majorité d'entre eux a accepté de répondre au questionnaire, permettant d'atteindre nos objectifs. Le choix des particuliers interrogés s'est fait au hasard des déplacements sur les sites enquêtés et le nombre de personnes sollicitées a été fonction de leur représentativité au sein de l'aire de butinage considérée, et plus précisément du type de paysage. Enfin l'ensemble des municipalités de chaque site a été interrogé.

4.5.3. Résultats et discussion

4.5.3.a. Superficie couverte par les enquêtes

Sur les dix-huit ruchers, 678 particuliers, 435 exploitants agricoles, 54 municipalités et 75 structures publiques et privées ont répondu aux questionnaires, représentant une surface enquêtée de près de la moitié (20735 ha) de la surface totale couverte par les aires de butinage étudiées (49122 ha) ([Tableau 17](#)).

Tableau 17. Nombre de personnes par catégorie ayant répondu aux questionnaires et surfaces enquêtées (en hectares) pour chaque rucher de l'étude (A à P) et par type paysager (bocage, cultures, urbain, insulaire). PA : professionnels agricoles ; P : particuliers ; M : municipalités ; SPP : structures publiques et privées.

rucher	type paysager	Nombre de personnes enquêtées / surfaces enquêtées correspondantes								Surface totale enquêtée
		PA		P		M		SPP		
A	bocage	56	2039,33	24	64,92	1	1,75	1	NR	2106,00
B	cultures	18	1243,23	0	0,00	7	364,55	0	0,00	1607,78
C	urbain	26	938,94	36	2,94	7	7,22	11	20,48	969,58
D	cultures	21	1570,79	33	6,74	4	6,50	0	0,00	1584,03
E	urbain	13	382,36	64	26,18	3	136,75	24	180,5	725,88
F	bocage	27	1679,45	20	3,80	2	2,59	0	0,00	1685,84
G	cultures	40	1496,74	1	2,40	3	1,00	1	2,36	1502,50
H	bocage	37	1712,75	33	5,16	2	0,99	0	0,00	1718,90
I	bocage	28	1539,47	36	2,25	2	19,45	8	1,05	1562,22
IO	insulaire	6	11,50	17	0,14	1	NR	0	0,00	11,64
IY	insulaire	8	48,10	50	6,67	0	0,00	0	0,00	54,77
J	cultures	55	2016,28	0	0,00	3	0,50	1	NR	2016,78
K	urbain	0	0,00	139	18,44	2	0,06	18	51,5	70,00
L	cultures	25	1236,72	0	0,00	4	2,35	0	0,00	1239,07
M	bocage	36	2010,00	29	2,08	3	2,35	0	0,00	2105,43
N	urbain	0	0,00	168	8,18	2	102,95	3	11,08	122,21
O	bocage	28	1225,46	1	NR	4	0,31	2	1,50	1227,27
P	urbain	11	302,96	27	6,19	4	111,93	6	3,52	424,60
total		435	19454,08	678	156,09	54	761,25	75	272,0	20734,5

Les traitements liés au jardinage et à l'entretien des espaces de loisirs ou d'ornement ne représentant en tonnage qu'une faible proportion du total utilisé en agriculture, la pression d'enquêtes a été portée sur les professionnels agricoles. Ainsi pour les ruchers de cultures et de bocage, 51,9 à 93,7 % de la superficie totale agricole (et plus de 75 % pour 2/3 des ruchers) et 43,3 à 72,1 % de la superficie totale de l'aire de butinage ont été renseignés concernant l'utilisation des substances à usages phytosanitaires et vétérinaires (Tableau 18). Ces résultats permettent d'obtenir une image très représentative des traitements et des molécules utilisées sur le terrain en 2008 et notamment dans le domaine agricole.

Tableau 18. Proportion de la surface agricole enquêtée (SAE) par rapport à (i) la superficie totale agricole (STA) de l'aire de butinage, (ii) la superficie totale de l'aire de butinage (STB = 2827 ha).

rucher	type paysager	SAE	STA	% SAE/STA	% SAE/STB
A	bocage	2039	2176	93,7 %	72,1 %
B	cultures	1243	2060	60,3 %	44,0 %
C	urbain	939	1251	75,1 %	33,2 %
D	cultures	1571	1821	86,3 %	55,6 %
E	urbain	382	382	100,0 %	13,5 %
F	bocage	1679	2391	70,2 %	59,4 %
G	cultures	1497	1920	78,0 %	52,9 %
H	bocage	1713	1877	91,4 %	60,6 %
I	bocage	1539	1777	86,6 %	54,4 %
IO	insulaire	12	520	2,3 %	0,4 %
IY	insulaire	48	394	12,2 %	1,7 %
J	cultures	2016	2518	80,1 %	71,3 %
K	urbain	0	4	0,0 %	0,0 %
L	cultures	1237	2257	54,8 %	43,7 %
M	bocage	2010	2527	79,5 %	71,1 %
N	urbain	0	60	0,0 %	0,0 %
O	bocage	1225	2359	51,9 %	43,3 %
P	urbain	303	765	39,6 %	10,7 %

4.5.3.b. Traitements réalisés en 2008 sur les aires de butinage des 18 ruchers de l'étude

La récolte des informations sur les pratiques culturales et les traitements phytosanitaires associés est une donnée essentielle dans les évaluations de la pression phytosanitaire globale des zones agricoles. En règle générale, cette pression phytosanitaire est mesurée à partir du calcul de l'Indicateur de Fréquence des Traitements (IFT) qui correspond à la moyenne par hectare du nombre de traitements effectués en produits, pondérée par le rapport entre la dose utilisée et la dose homologuée (Pingault, 2007 ; Brunet *et al.*, 2008). L'IFT concerne donc un ensemble de molécules très différentes mais ne prend pas en compte leur toxicité propre ; il reste par conséquent un indicateur limité pour évaluer les risques potentiels de l'utilisation de ces pesticides ainsi que leurs impacts sur l'environnement. Néanmoins, cet indicateur donne une image intéressante de l'utilisation des pesticides ; dans cette partie, les données brutes du nombre de traitements par rucher et par type paysager sont

utilisées pour évaluer le nombre moyen de traitements effectués par hectare de surface enquêtée (Tableau 19).

Tableau 19. Récapitulatif, par type paysager, du nombre de traitements phytosanitaires et vétérinaires réalisés dans les aires de butinage des 18 ruchers de l'étude et rapporté à un hectare de surface enquêtée. Bocage : ruchers A, F, H, I, M et O ; Culture : B, D, G, J, et L ; Urbain : C, E, K, N et P ; Insulaire : IO et IY.

rucher	nombre de traitements phytosanitaires		nombre de traitements vétérinaires	total	Nombre moyen de traitements par ha de surface enquêtée
	usage professionnel agricole	autres usages			
Bocage	5023	420	975	5443	0,52
Cultures	5754	133	397	5887	0,74
Urbain	872	791	246	1663	0,72
Insulaire	48	86	37	134	2,02

En considérant l'ensemble des ruchers de l'étude et sans tenir compte de la part totale de la surface enquêtée par rapport à la surface totale de l'aire de butinage, le nombre de traitements phytosanitaires et vétérinaires est plus important en paysage de type cultures, en paysage de type bocage, en paysage urbain puis enfin en paysage insulaire (Tableau 19). Les ruchers en paysage de type bocage sont caractérisés par un nombre de traitements vétérinaires beaucoup plus élevé en lien direct avec la part importante de l'élevage dans ce type de paysage dominé par des parcelles de prairies (partie 1.4.). Les paysages de type urbain et insulaire sont logiquement dominés par la proportion plus importante des traitements liés à un usage privé ou d'ornement, cette part augmentant considérablement le nombre moyen de traitements par hectare de surface enquêtée pour les ruchers insulaires. De plus, dans ce type de paysage, les surfaces traitées sont très nettement inférieures à celles des paysages agricoles, ce qui rend l'interprétation de ce nombre particulièrement délicate. A titre d'exemple, le nombre moyen de traitements à l'hectare peut varier de 1 à 0,02, d'un paysage morcelé urbain ou insulaire, à un paysage agricole : en effet, 1 traitement sur 50 parcelles de 1 hectare dans le premier type paysager est « équivalent » en terme de surface traitée à 1 traitement sur 50 hectares dans le second type !

En considérant uniquement les traitements phytosanitaires (tableau 19) et les surfaces agricoles (tableau 18), et en suggérant que la dose appliquée sur la surface traitée correspond à la dose homologuée de référence pour le produit utilisé, une IFT de 0,49 est obtenue pour le

paysage de type bocage et de 0,76 pour le paysage de type culture. Ces valeurs *a priori* surestimées de l'IFT sont bien inférieures à celle calculée pour les paysages de grandes cultures français en 2006 (IFT = 3,8 ; [Butaut et al., 2011](#)). Cette différence semble avant tout souligner que les enquêtes réalisées au cours de cette étude ne donnent qu'une image relative de l'utilisation des produits phytosanitaires et que les chiffres obtenus représenteraient le plafond bas du nombre de traitements réalisés au cours d'une année sur chaque aire de butinage des abeilles. De plus, si l'IFT calculé semble très faible alors que le nombre de traitements semble particulièrement élevé, il laisse imaginer le nombre réel de traitements réalisés chaque année !

4.5.3.c. Molécules utilisées en 2008 sur les aires de butinage des 18 ruchers de l'étude

La prise en compte du nombre de traitements effectués n'est qu'un aspect de l'évaluation de la contamination environnementale. Les données sur le contenu effectif des traitements et par conséquent les molécules utilisées représentent en effet l'information capitale dans la mesure où la nature de la molécule, la dose utilisée et son association à une autre molécule conditionnent l'impact sur les organismes vivants cibles et non-cibles ([Amiard, 2011](#)). Cet aspect est essentiel d'autant que plusieurs molécules différentes peuvent être utilisées lors d'un même traitement. Compte tenu des résultats d'analyses toxicologiques ([chapitre 4.3. ; Annexe 2](#)), seules les molécules phytosanitaires et vétérinaires d'usage agricole sont considérées dans cette partie.

Le nombre de molécules différentes utilisées semble plus élevé pour les aires de butinage des ruchers de type cultures, bocage, urbain puis insulaire ([Tableau 20](#)). Au regard de la faible part de surface enquêtée pour les ruchers de ville ([Tableau 17](#)), la diversité des molécules utilisées dans ce type de paysage est très importante et proche de celle des paysages agricoles. Bien que les surfaces traitées ne soient pas comparables avec celles des paysages agricoles, les enquêtes révèlent cependant une forte pression par les produits phytosanitaires en zone urbaine.

Tableau 20. Comparaison, par type paysager, du nombre de molécules différentes utilisées en 2008 dans les ruchers de l'étude par type paysager (résultats des enquêtes) et du nombre de molécules différentes recherchées et retrouvées dans les matrices apicoles (résultats des analyses toxicologiques).

rucher	Nombre de molécules utilisées	Nombre de molécules utilisées et recherchées	Nombre de molécules utilisées, recherchées et retrouvées dans les matrices apicoles	Nombre de molécules retrouvées dans les matrices apicoles et non utilisées
Bocage	201	24	9	10
Cultures	223	35	16	8
Urbain	161	21	6	9
Insulaire	20	6	1	10

Le [tableau 20](#) montre le grand nombre de molécules utilisées sur les aires de butinage autour des ruchers de l'étude en 2008 mais également le faible nombre d'entre elles qui ont été effectivement (i) recherchées dans les matrices apicoles prélevées (de 12 % en bocage à 30 % en paysage insulaire) et (ii) retrouvées (de 4 % bocage et en ville, à 7 % en cultures) ([Annexe 2](#)). De même, il apparaît que 32 à 83 % des molécules détectées dans les échantillons d'abeilles, de miel et de pollen n'auraient pas été utilisées sur le terrain d'après les enquêtes réalisées ([Tableau 21](#)). Ce résultat peut être attribué à (i) un manque d'exhaustivité des enquêtes, (ii) des utilisations non déclarées voire illégales de certains produits (par exemple la dieldrine retrouvée dans un échantillon de pollen est interdite depuis 1992), (iii) une prospection des abeilles en dehors de la zone de butinage étudiée, les distances parcourues pouvant en effet s'étendre jusqu'à une dizaine de kilomètres ([Beekman et Ratnieks, 2000](#)), et (iv) une contamination persistante dans l'environnement ou les matrices apicoles telles que les cires, pour des molécules comme le coumaphos par exemple ([Van Buren et al., 1992](#) ; [Wallner, 1999](#)).

Ces résultats mettent en évidence que lors d'une étude de cette ampleur dont l'objectif est d'évaluer la contamination des matrices apicoles et de les utiliser comme sentinelles de la contamination environnementale, il convient de réaliser les enquêtes sur les utilisations des produits phytosanitaires et des médicaments vétérinaires en parallèle des prélèvements mais en amont des analyses afin de cibler au mieux les molécules à rechercher. Pour les ruchers en paysage de type cultures, près de 50 % des molécules recherchées et effectivement utilisées sur le terrain ont été détectées dans les échantillons ([Tableau 20](#)). Ce chiffre se rapproche des

résultats de l'étude exhaustive de Mullin *et al.* (2010) sur des ruchers de paysages agricoles, lors de laquelle 171 pesticides (et leurs métabolites) ont été recherchés et 69 % d'entre eux (soit 118 pesticides) ont été retrouvés dans les matrices apicoles.

Tableau 21. Liste des molécules retrouvées (résultats des analyses toxicologiques) et utilisées (résultats des enquêtes) dans les matrices apicoles par type paysager pour les échantillons de l'année 2008

molécules	Molécules retrouvées dans les matrices apicoles en 2008 par type paysager				Molécules utilisées et retrouvées en 2008 par type paysager			
	bocage	cultures	urbain	insulaire	bocage	cultures	urbain	insulaire
Amitraze	x	x	x	x	x	x	x	
Bénalaxyl				x				
Bupirimate	x	x	x			x	x	
Buprofézine				x				
Butoxyde de pipéronyl	x	x	x	x				
Carbaryl	x	x	x	x				
Carbendazime	x	x	x	x	x	x		
Carbofurane	x	x			x	x		
Chlorpyrifos	x	x	x					
Chlorpyrifos-méthyl		x	x					
Coumaphos	x	x	x	x				x
Cyperméthrine		x				x		
Cyproconazole	x	x	x		x	x	x	
Diazinon	x							
Dieldrine			x					
Diéthofencarbe		x				x		
Diméthoate		x				x		
Endosulfan II		x						
Fénoxycarbe		x				x		
Flusilazole	x	x			x	x		
Héxythiazox		x				x		
Imazalil	x	x	x	x				
Imidaclopride		x	x			x	x	
Phosalone		x						
Phosmet	x	x	x	x		x		
Phoxim	x		x					
Prochloraze	x				x			
Propiconazole			x				x	
Pyriproxyfène	x	x	x	x		x	x	
Tau-fluvalinate	x	x			x	x		
Thiophanate-méthyl	x	x			x	x		
Triadiménol	x			x	x			
Triphénylphosphate*	x	x	x	x				
TOTAL	20	25	17	12	9	16	6	1

*Le triphénylphosphate est un retardateur de flamme et ne correspond à aucune utilisation phytosanitaire ou vétérinaire

Bien que les pratiques d'utilisation produits phytosanitaires et des médicaments vétérinaires au sein de chaque type paysager puissent paraître spécifiques, en lien direct avec une couverture du sol et une flore caractéristiques (cultures : flore cultivée ; bocage : flore de

prairies ; urbain : flore ornementale), le [tableau 21](#) montre que la majorité des molécules utilisées et détectées dans les matrices apicoles sont communes aux différents types paysagers. Ce résultat souligne à la fois l'homogénéité des molécules autorisées en usage agricole et non-agricole, et l'homogénéité des stratégies de butinage et donc de la flore exploitée par les abeilles quels que soient le rucher et le paysage considérés ([Louveaux, 1959](#) ; [Almeida-Muradian et al., 2005](#) ; [Tuell et al., 2008](#) ; [Boff et al., 2011](#)).

4.5.4. Bilan des enquêtes

Sur l'ensemble des aires de butinage, les enquêtes ont révélé un nombre conséquent de molécules utilisées et de traitements phytosanitaires et vétérinaires effectués, laissant présager une contamination réelle et importante de l'environnement. La contamination des ruchers à travers la contamination des trois matrices apicoles, abeilles, miel et pollen, en est un bon reflet même si la liste des molécules recherchées n'est pas en totale adéquation avec la liste des molécules effectivement utilisées sur le terrain. Il apparaît également que même dans des paysages *a priori* moins exposés à la pression phytosanitaire, tels que les paysages urbains, cette contamination est importante et se retrouve dans les ruchers. Les résultats d'enquêtes explorés ici ne donnent par ailleurs qu'une image qualitative de la contamination environnementale mais il ne faut pas oublier que les quantités de molécules actives utilisées et leur toxicité propre (ou en association) vont conditionner les effets potentiels sur la faune cible et non-cible. Notons finalement que l'ambiguïté même du concept du plan Ecophyto 2018 et la perspective de réduction de 50 % de l'usage des pesticides agricoles et non-agricoles reposent essentiellement sur cette notion d'image qualitative ou quantitative.

4.6. Conclusion concernant la contamination des matrices apicoles par les pesticides et médicaments vétérinaires

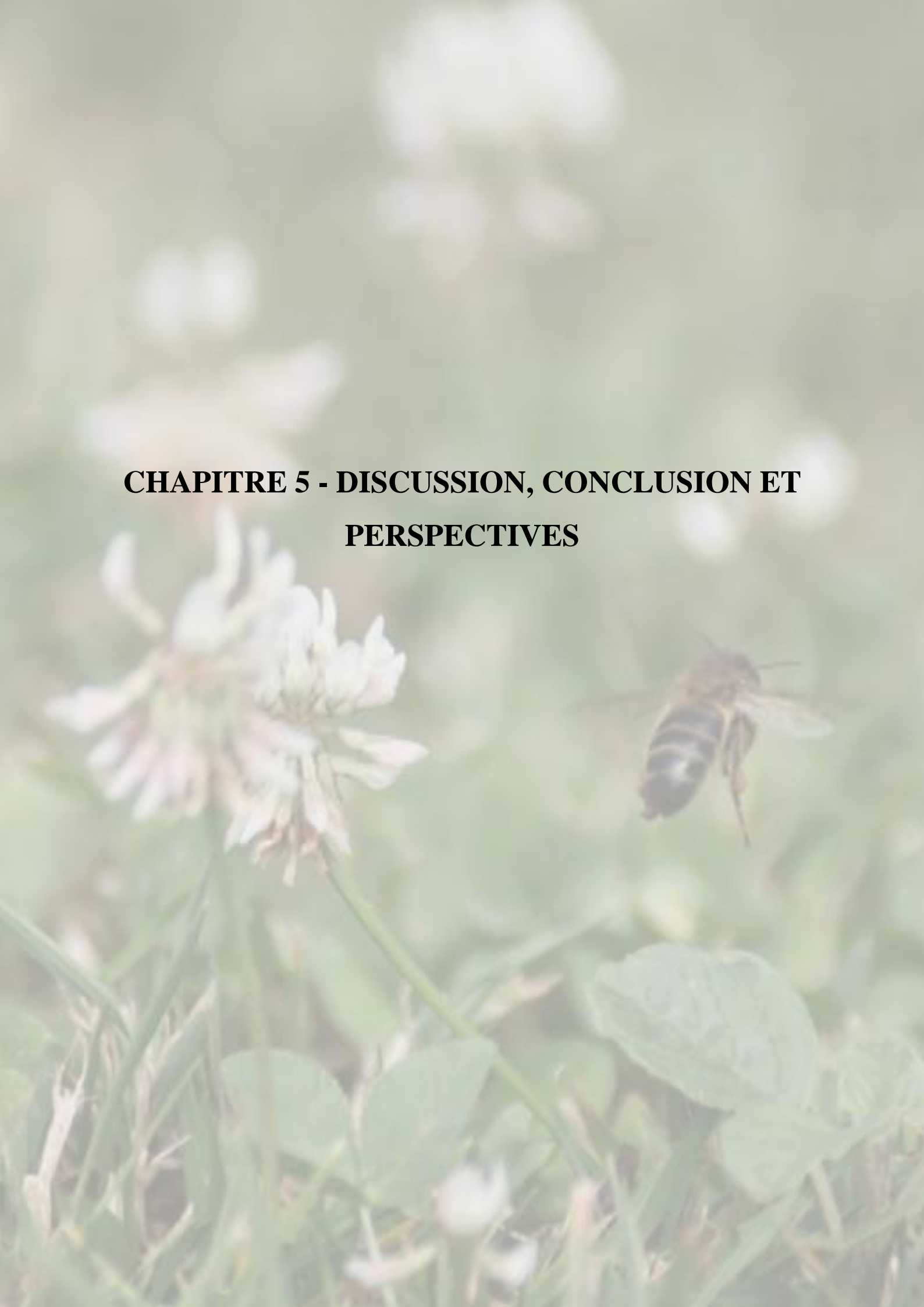
La récolte d'échantillons d'abeilles, de miel et de pollen au sein des dix-huit ruchers de l'étude a permis de remplir un double objectif, le second étant le résultat de la réussite du premier : (i) la mise au point d'une méthode fiable et reproductible pour identifier et quantifier un maximum de résidus de traitements agricoles, vétérinaires et de jardinage dans les matrices apicoles, (ii) l'évaluation de la contamination de ces matrices notamment en fonction du paysage et de la période de prélèvements.

L'analyse multirésidus utilisée a permis de mettre en évidence la présence de 36 résidus sur les 80 recherchés dans les matrices apicoles ([Annexe 2](#)). Les abeilles, le miel et le pollen ont présenté des sensibilités différentes, le miel apparaissant comme la matrice la plus contaminée en nombre de résidus détectés ou quantifiés et le pollen apparaissant comme la matrice la plus contaminée en concentrations mesurées. Ces différences sont à rapprocher des limites de détection et de quantification différentes dans les trois matrices et plus faibles dans les matrices miel et abeilles. A valeurs équivalentes, la matrice pollen serait vraisemblablement la matrice à utiliser pour évaluer la contamination environnementale par les pesticides et les médicaments vétérinaires. Quoi qu'il en soit, la contamination des matrices apicoles est importante et met en avant des résidus majoritaires (carbendazime, amitraze et coumaphos) et des familles de molécules pour lesquelles les concentrations mesurées sont importantes (insecticides organophosphorés). Ces résidus de traitements correspondent à des molécules largement utilisées dans l'environnement intrinsèque ou extrinsèque des ruchers, qu'il s'agisse des fongicides, des acaricides ou des insecticides. En effet, le risque qu'un pesticide ou un médicament vétérinaire se retrouve dans les matrices apicoles dépend à la fois de sa nature et de ses propriétés (toxicité, rémanence, dégradation du principe actif en métabolites secondaires, ...), de son mode d'action (contact, systémique, ...) et de ses conditions d'utilisation (heures, conditions météorologiques, matériel utilisé, ...) ([Koch et Weisser, 2001](#)). Si le contexte environnemental propre à chaque rucher peut influencer la contamination des matrices apicoles par les pesticides et les médicaments vétérinaires, de manière générale, les ruchers de paysage cultures semblent les plus

contaminés et les ruchers de paysage insulaire semblent les moins contaminés. Enfin, les périodes de printemps apparaissent comme les périodes les plus contaminées en lien direct avec une pression d'utilisation des pesticides d'usage agricole et de jardinage plus importante ; les périodes d'automne, périodes des traitements apicoles, sont logiquement dominées par les molécules acaricides d'usage apicole.

Au vu du nombre de prélèvements réalisés et des enquêtes effectuées, cette contamination importante ne représente pourtant qu'une image ponctuelle de la contamination potentielle environnementale par les pesticides et les médicaments vétérinaires. Ces résultats soulèvent donc le problème de la pression phytosanitaire et vétérinaire subie par les abeilles, de l'action synergique potentielle de ces cocktails de molécules et de leurs effets à court et long termes sur les individus et la colonie dans son intégralité.

**CHAPITRE 5 - DISCUSSION, CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**



5.1. Les matrices apicoles comme sentinelles de la contamination environnementale

La contamination des abeilles et des matrices apicoles associées par les polluants environnementaux a été relativement peu étudiée avant les années 1990. La grande majorité des études visait, soit à rechercher les métaux lourds dans les matrices consommées, le miel plus particulièrement (Otto et Jekat, 1977 ; Morse et Lisk, 1980 ; Kerkvliet, 1983 ; Stein et Umland, 1986 ; Jones, 1987), soit à montrer les effets de certains pesticides sur les abeilles (Waller et Barker, 1979 ; Johansen *et al.*, 1983 ; Murray, 1985 ; MacKenzie et Winston, 1989) ; finalement, les études sur l'exposition et la contamination par les pesticides et autres contaminants environnementaux étaient rares (Anderson et Atkins, 1968 ; Barker *et al.*, 1980 ; Morse *et al.*, 1987). Au début des années 1990, la multiplication des familles de pesticides, l'arrivée des insecticides systémiques, les premières mortalités importantes d'abeilles en Europe, conjointement à une prise de conscience écologique accrue, ont contribué à une augmentation conséquente du nombre de programmes de recherche sur la contamination des matrices apicoles par les polluants environnementaux. C'est à cette période notamment, que le concept d'abeille sentinelle de l'environnement, déjà utilisé par certains auteurs quelques années auparavant (Bromenshenk *et al.*, 1985 ; Jones, 1987 ; Voget, 1989), connaît son véritable essor (Conti et Botrè, 2001 ; Devillers et Pham-Delègue, 2002 ; Celli et Maccagnani, 2003 ; Porrini *et al.*, 2003 ; Ghini *et al.*, 2004). L'utilisation de l'abeille, du miel et du pollen comme sentinelles, présente un double enjeu. Premièrement, il s'agit bien de déterminer les niveaux de contamination de différents milieux par les xénobiotiques (Leita *et al.*, 1996 ; Devillers *et coll.*, 2005 ; Perugini *et al.*, 2009) ; deuxièmement, les études en zones agricoles sur les pesticides permettent d'avoir une image fiable à la fois de la contamination de l'environnement mais également de la contamination des matrices apicoles, donnée factuelle utilisable dans l'analyse des facteurs des troubles qui touchent les colonies (Balayiannis et Balayiannis, 2008 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Chauzat *et al.*, 2011). L'ensemble de ces travaux de surveillance concerne, soit un nombre limité de matrices apicoles (abeilles : Ghini *et al.*, 2004 ; Roman 2010 ; miel : Ponikvar *et al.*, 2005 ; Balayiannis et Balayiannis, 2008 ; pollen : Kalbande *et al.*, 2008 ; Roman, 2009), soit un seul type de xénobiotiques (pesticides : Balayiannis et Balayiannis, 2008 ; Chauzat *et al.*, 2011 ; HAPs : Perugini *et al.*, 2009 ; dioxyde de soufre : Ponikvar *et al.*, 2005 ; métaux : Morgano *et al.*, 2010 ; Perugini *et al.*,

2011), soit un seul type de paysage (agricole : [Balayiannis et Balayiannis, 2008](#) ; [Mullin et al., 2010](#) ; [Chauzat et al., 2011](#) ; urbain : [Kalbande et al., 2008](#)). Notre étude s'inscrit parfaitement dans ce contexte de surveillance de la pollution de l'environnement par les matrices apicoles mais apporte en précision dans l'analyse environnementale dans la mesure où 3 types de xénobiotiques sont recherchés (HAPs, plomb et pesticides), dans 3 matrices (abeilles, miel et pollen), sur 4 types paysagers différents (insulaire, cultures, bocage et urbain).

Alors que la plupart des travaux s'appuie sur l'analyse stricte de la contamination d'une ou plusieurs matrices apicoles par des déterminations des concentrations pour caractériser la présence des polluants dans le milieu et confirmer le caractère de sentinelle de ces matrices, notre étude, tout au moins concernant les pesticides, tente de comparer et de faire le lien entre la contamination effective du milieu (réalisation d'enquêtes auprès des utilisateurs du paysage) et celles des matrices apicoles. Si notre démarche scientifique semble essentielle pour démontrer la pertinence des matrices apicoles comme sentinelles, elle soulève aussi les imperfections de notre protocole et démontre surtout toute la complexité d'un tel travail. Les contraintes sont en effet nombreuses et peuvent être liées à trois facteurs principaux :

- Les matrices elles-mêmes constituent la première difficulté. Bien que techniquement assez simples, des prélèvements répétés (pour obtenir une cinétique de contamination) peuvent mettre en péril la survie de la colonie et l'activité apicole professionnelle associée (dans le cadre de travaux de recherche de terrain en conditions réelles avec des apiculteurs bénévoles partenaires). Le nombre restreint de prélèvements, en l'occurrence 4 par saison apicole dans notre étude, ne va donc fournir qu'une image ponctuelle de la contamination environnementale. Par ailleurs, il est connu qu'en fonction des ressources floristiques de l'environnement du rucher, les distances de butinage sont variables, 90 % des butinages se faisant à moins de 5 km de la ruche dans le cas de ressources abondantes ([Visscher et Seeley, 1982](#)), contre 90 % à plus de 6 km et 10 % à plus de 9 km dans le cas contraire ([Beekman et Ratnieks, 2000](#)). Les abeilles pouvant se contaminer pendant leur activité de vol, il est donc difficile de définir précisément l'origine de la contamination, même si les analyses palynologiques nous renseignent sur les plantes visitées.
- La méthode analytique de détection et de quantification des résidus constitue une autre contrainte. En fonction de la technique choisie, mono-résidu ou multi-

résidus, les limites de détection et de quantification sont différentes. L'analyse mono-résidu permet de travailler avec des valeurs plus basses et donc plus précises (< ppb), mais ne permet de doser qu'une seule molécule à la fois. Cette technique plus fine est aussi plus coûteuse dès qu'il s'agit de rechercher plusieurs résidus. Finalement quelle que soit la méthode retenue, la technique limitera le nombre de molécules retrouvées.

- La troisième difficulté est liée à la réalisation des enquêtes. La définition même de la surface de prospection est un obstacle majeur si l'on considère les distances parcourues par les abeilles lors de leur activité de butinage ou de récolte d'eau. Il est évident que plus la surface à enquêter sera grande, plus la réalisation d'enquêtes exhaustives pour déterminer les usages de pesticides sur l'aire de butinage autour du rucher sera complexe, et le lien entre utilisation sur le terrain et présence dans les matrices par conséquent fastidieux à établir. Dans ce sens, alors que les registres phytosanitaires tenus par les agriculteurs sont des outils précieux, les enquêtes auprès des particuliers, forts consommateurs de pesticides compte tenu des surfaces à traiter, ne sont jamais aussi fines et fiables et ajoutent autant d'imprécisions que le nombre d'enquêtes est important.

Ces enquêtes, aussi difficiles soient-elles à mener, montrent, d'une part, la multiplicité des traitements effectués et des molécules utilisées, d'autre part, la prise de conscience générale des problèmes environnementaux et le souci de transparence dans les traitements phytosanitaires, notamment de la part des professionnels de l'agriculture.

Les travaux de recherche menés sur plusieurs matrices montrent que la matrice miel est toujours la matrice la moins contaminée par rapport aux matrices abeilles et pollen (Bogdanov, 2006 ; Tuzen *et al.*, 2007 ; Perugini *et al.*, 2009 ; Eremia *et al.*, 2010 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Chauzat *et al.*, 2011), que la contamination ait pour origine l'air ou le sol *via* le végétal. Le miel est produit par les abeilles à partir du nectar récolté dans les nectaires souvent situés à la base des pièces florales et est donc moins exposé aux résidus atmosphériques que les abeilles ou le pollen. De même, l'étude réalisée par Cozmuta *et al.* (2012) sur les transferts de polluants du sol vers les organes de la plante, les abeilles et les matrices apicoles associées, montre que les concentrations déterminées dans le miel sont les plus faibles (avec la gelée royale). Néanmoins, le miel demeure une sentinelle de la présence de polluants environnementaux largement utilisée (Balayiannis et Balayiannis, 2008) du fait de sa consommation mais vraisemblablement aussi de sa facilité de prélèvements et des quantités

récoltables. Le nombre de pesticides retrouvés dans notre étude est plus important dans cette matrice que dans les abeilles et le pollen ce qui ne remet toutefois pas en cause les propos précédents. En effet, en considérant que les limites de détection et de quantification dans cette matrice étaient plus faibles et les concentrations mesurées étaient les plus élevées dans le pollen, il est vraisemblable qu'à limites de détection équivalentes le nombre de molécules détectées dans le pollen aurait été le plus élevé. L'ensemble de nos résultats confirme par conséquent que le pollen et les abeilles seraient les matrices apicoles les plus appropriées pour évaluer la contamination de l'environnement. Néanmoins, qu'il s'agisse du miel, du pollen ou des abeilles, ces matrices ont le double inconvénient de n'être récoltables, ni lors de conditions météorologiques défavorables, l'activité de butinage étant alors réduite ou nulle (températures basses, pluie, vent fort, ...), ni sur les périodes hivernales (de novembre à mars en règle générale).

Au sein d'un même rucher, les stratégies de butinage sont propres à chaque colonie. Chacune d'entre elles présente donc des « patterns » de contamination par les polluants environnementaux spécifiques et représentatifs de leurs parcours et des plantes visitées au sein de leur aire de butinage. Dans le cadre d'une évaluation de la contamination du milieu, il s'avère judicieux de travailler à l'échelle du rucher, et donc de regrouper les échantillons prélevés dans chaque colonie, comme image de la somme des contaminations de chacune des colonies. Cette méthode, retenue dans le cadre de notre travail, est appliquée dans la plupart des études environnementales (Chauzat *et al.*, 2011). Il serait particulièrement intéressant, dans un souci de validation de la méthode, de comparer la contamination des abeilles, du miel et du pollen sur des échantillons « poolés » à l'échelle du rucher et sur des échantillons analysés à l'échelle de la colonie : la contamination « du pool » est-elle effectivement représentative de l'ensemble des contaminations « individuelles » ou la présence de résidus est-elle masquée ou exacerbée ?

Quoiqu'il en soit, notre étude et bon nombre d'études antérieures prouvent, (i) la contamination importante des matrices apicoles (118 pesticides différents retrouvés et jusqu'à 31 dans un échantillon de pollen par Mullin *et al.*, 2010), (ii) le rôle de sentinelle de la présence de polluants environnementaux joué par ces matrices, (iii) que cette contamination n'est qu'une image partielle de la contamination globale de l'environnement par les xénobiotiques.

5.2. Le contexte paysager et la période, des facteurs de variation de la contamination des matrices apicoles

A l'heure où les colonies d'abeilles connaissent des pertes généralisées sans précédent, et bien que l'ensemble des milieux paraissent touchés, la prise en compte du paysage comme un des facteurs essentiels au maintien des colonies s'impose comme une évidence. La multiplication des ruchers en ville ou en zones supposées « préservées » en est un exemple flagrant. Notre étude sur des ruchers de contextes paysagers différents apporte quelques éléments de réflexion dans ce sens et sur la contamination des ruchers en fonction du paysage.

Nombre d'études antérieures montrent que les échantillons prélevés dans des ruchers de ville, de zones industrialisées ou proches d'axes routiers sont plus contaminés par les HAPs et les métaux que les échantillons de zones préservées, même si l'étude récente de [Perugini et al. \(2011\)](#) ne met pas en avant de différences significatives de contamination par les HAPs entre les zones urbanisées et des zones naturelles. Notre étude montre des profils de contamination par les HAPs et le plomb variables en fonction de la matrice et dépendants de pics de contamination qui reflètent plus les conditions environnementales propres à chaque rucher qu'à un type paysager.

Concernant la contamination des matrices apicoles par les substances à usages phytosanitaires et vétérinaires dans des paysages différents, les données bibliographiques sont à notre connaissance, inexistantes. En effet, la totalité des travaux se rapportent à des échantillons prélevés dans des zones agricoles, zones d'utilisation intensive des pesticides, qu'il s'agisse de grandes cultures (tournesol, blé, maïs, colza, coton, luzerne,...), de maraîchage (betterave, pommes de terre, ...), de vergers (pommes, agrumes, ...) ou de vignes ([Ghini et al., 2004](#) ; [Balayiannis et Balayiannis, 2008](#) ; [Mullin et al., 2010](#) ; [Chauzat et al., 2011](#) ; [Ondo Zue Abaga et al., 2011](#) ; [Krupke et al., 2012](#)). Parmi les vingt-quatre sites suivis dans l'étude de [Chauzat et al. \(2011\)](#), un seul était situé dans un paysage non agricole, de forêt et de maquis méditerranéens ; la comparaison des concentrations déterminées en fonction du type paysager n'est toutefois pas détaillée dans la mesure où elle n'a été réalisée que pour les groupes imidaclopride et fipronil et que les résultats ne montrent pas de

différences significatives. Notre étude s'inscrit donc comme la seule à comparer la contamination des matrices apicoles entre des paysages urbains, insulaires, de bocage et de cultures. Les ruchers en paysage de cultures semblent plus contaminés que les autres ruchers avec une contamination décroissante des paysages dans le sens cultures > bocage > urbain > insulaire. Cette tendance confirme que les paysages de zones agricoles (grandes cultures et élevages) sont les sites sur lesquels les matrices apicoles sont les plus contaminées, d'autant que les concentrations déterminées y sont généralement aussi les plus élevées. Etant donné le maillage territorial des ruchers, ce résultat est important si l'on considère que la surface agricole utile française couvre 54 % du territoire national (Bernard *et al.*, 2007). Il faut cependant souligner que des différences individuelles fortes existent entre les ruchers étudiés. En effet, certains ruchers de paysage urbain présentent un nombre de molécules différentes plus important (hors molécules d'usage apicole), quelle que soit la matrice considérée, que certains ruchers en paysages ruraux de type bocage ou cultures. De même, certaines molécules, dont les effets néfastes pour l'abeille sont reconnus, sont détectées dans les échantillons collectés en ville et sont absents dans les échantillons de paysages ruraux : dans la matrice pollen par exemple, l'unique détection d'imidaclopride est réalisée dans un échantillon collecté en 2008 dans un rucher du cœur de Nantes. Ces résultats sont cohérents avec les résultats des études menées en villes de Nantes et d'Angers, qui montrent que des molécules utilisées en zones arboricoles, de viticulture ou de maraîchage situées à une vingtaine de kilomètres peuvent être détectées dans des prélèvements atmosphériques en ville (Air Pays de la Loire, 2003 et 2008). Comme nous l'avons évoqué, les abeilles peuvent parcourir de grandes distances à la recherche de ressources mellifères et pollinifères intéressantes. Les analyses palynologiques réalisées dans le cadre de notre étude (chapitre 1, partie 1.4.) montrent ainsi que des échantillons de pollen prélevés dans des ruchers de ville contiennent des pollens de plantes cultivées dont la zone d'origine est problématique et discutable. Ces butinages éventuels en dehors des aires urbaines pourraient en partie expliquer les contaminations importantes par les pesticides de certains échantillons. Il convient toutefois de relativiser cette hypothèse sachant que ces pollens sont le plus souvent minoritaires ; l'origine des pesticides serait donc plus vraisemblablement liée à un usage domestique par les particuliers. Les enquêtes réalisées confirment par ailleurs que de nombreuses molécules sont d'usage à la fois agricole et domestique. Finalement, si les abeilles, le miel et le pollen des ruchers ruraux semblent les plus contaminés, les matrices apicoles issus de ruchers de ville ne sont pas indemnes de contamination par les pesticides.

Ainsi, l'ensemble des analyses toxicologiques réalisées lors de notre étude montre une contamination généralisée des matrices apicoles par les xénobiotiques avec une contamination par les pesticides significativement plus importante pour les échantillons de paysages agricoles. Les « patterns » de distribution des contaminants répondent toutefois plus à des spécificités propres à chacun des ruchers.

Plusieurs études ont montré que la contamination par les xénobiotiques était fortement influencée par la période d'échantillonnage. Les concentrations en métaux, par exemple, déterminées dans les pollens et les abeilles semblent effectivement plus élevées lors des périodes sèches (Morgano *et al.*, 2010 ; Perugini *et al.*, 2011 ; Lambert *et al.*, 2012a). Cette tendance est valable pour l'ensemble des contaminations atmosphériques, la dispersion et le dépôt des résidus étant favorisés lorsque les précipitations sont faibles. Le nombre restreint de ruchers dans l'analyse des HAPs lors de notre étude et les pics ponctuels de contamination enregistrés ne permettent malheureusement pas de mettre en évidence une influence nette de la période sur la contamination par les HAPs. Ces périodes sèches ainsi qu'une pression phytosanitaire forte sont également mis en avant par Ghini *et al.* (2004) : les niveaux de contamination les plus importants dans les abeilles sont retrouvés à la fin du printemps et seraient associés aux traitements phytosanitaires et à de moindres précipitations. Les niveaux de contamination par les pesticides, mesurés dans notre étude, confirment ces résultats et sont plus élevés au printemps, même si cette tendance n'est pas retrouvée lors de la deuxième saison apicole (2009). Cette différence souligne une nouvelle fois la part importante des conditions environnementales dans la contamination des matrices apicoles : alors que les prélèvements ont été réalisés sur les mêmes semaines d'une année à l'autre, les conditions météorologiques n'ont pas été identiques et les conséquences directes se mesurent dans les analyses palynologiques, avec des relevés botaniques très différents pour certains ruchers sur la période de printemps. Ces écarts de phénologie entre 2008 et 2009 ont par conséquent eu un impact sur les dates de traitements phytosanitaires. Nos prélèvements étant ponctuels et limités à quatre par année, de telles différences ne sont pas compensées comme elles pourraient l'être en moyennant des mesures enregistrées sur un laps de temps plus long (deux prélèvements par semaine sur chacune des quatre grandes périodes de notre étude par exemple).

Comme la période d'échantillonnage a une influence sur la contamination des matrices apicoles par les pesticides, il est vraisemblable qu'à une échelle de temps encore plus petite des différences importantes puissent être enregistrées. Les échantillons de miel sont

susceptibles de donner une image de quelques jours à quelques mois de la contamination de l'environnement, les prélèvements d'abeilles et plus encore de pollen reflétant quant à eux la présence de résidus à un instant précis. Il est alors envisageable de penser que des prélèvements d'abeilles ou de pollen effectués à quelques jours voire même à quelques heures d'intervalle peuvent présenter des niveaux de contamination différents, en fonction notamment des conditions météorologiques, de l'activité des abeilles prospectrices, de l'activité des butineuses et des traitements réalisés sur les végétaux. A ce titre, lors d'une évaluation de la pollution environnementale, il serait particulièrement instructif de réaliser des prélèvements plusieurs fois dans la journée pendant plusieurs jours consécutifs pour établir une cinétique de contamination par les pesticides et tenter de définir précisément à quel instant les abeilles reflètent au mieux la contamination environnementale.

5.3. Evaluation de la toxicité pour l'Homme des résidus détectés dans les miels prélevés

La contamination du miel par les HAPs, le plomb et les pesticides est encore actuellement largement étudiée du fait des risques potentiels liés à sa consommation. Les prélèvements de miels réalisés dans le cadre de cette étude permettent d'évaluer le risque pour les consommateurs par rapport aux polluants environnementaux étudiés.

Sur le plan de la toxicologie alimentaire, le Comité d'Experts (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture/Organisation Mondiale de la Santé) sur les additifs alimentaires (OMS-JECFA) a fixé pour le benzo[a]pyrène une dose virtuellement sûre (DVS) de 5 ng/kg de poids corporel par jour. Selon la ration alimentaire quotidienne théorique maximale standardisée, l'Homme est considéré consommer quotidiennement 20 g de miel. En se basant sur la concentration la plus élevée en benzo[a]pyrène déterminée dans le miel (0,83 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), la consommation quotidienne de ce miel ne représente que 5,5 % de la DVS. De même, l'OMS-JECFA a fixé pour le plomb en 2006, une dose hebdomadaire tolérable provisoire de 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel par semaine, soit une dose journalière admissible (DJA) de 3,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour. En se basant sur la concentration la plus élevée en plomb déterminée dans le miel au cours des deux campagnes de prélèvements de notre étude ([Tableau 8](#) ; 0,378 $\mu\text{g.g}^{-1}$), et la ration alimentaire quotidienne théorique, la consommation quotidienne de ce miel ne représente que 3,5 % de la DJA. Au vu des concentrations retrouvées dans les miels de notre étude et en tenant compte des habitudes alimentaires de la population française métropolitaine, la contamination du miel prélevé par les HAPs et le plomb ne pose pas de problème de santé publique.

De la même façon, la toxicité des pesticides dans le miel pour le consommateur a été évaluée en comparant la concentration maximale de chacun des résidus détectés ou quantifiés, et la dose journalière admissible pour chaque résidu. Lorsque la concentration du résidu n'a pu être quantifiée ($> \text{LOD}$ et $< \text{LOQ}$), cette concentration a été fixée à la valeur la plus haute c'est-à-dire la LOQ. Les doses d'exposition pour chaque résidu sont récapitulées en [Annexe 5](#). En se basant sur les concentrations maximales pour chaque molécule retrouvée dans nos échantillons de miel ([Lambert *et al.*, soumis ; Table 3](#)), la consommation quotidienne des

miels récoltés ne représente, dans le plus élevé des cas, que moins de 2,33 % de la DJA. Ainsi, suivant les concentrations mesurées et les habitudes alimentaires de la population française métropolitaine, la contamination des miels par les 80 pesticides recherchés dans notre étude ne pose pas de problème de santé publique.

Bien que sa consommation soit de plus en plus répandue, le pollen ne fait pas encore partie du panier de la ménagère, et la ration alimentaire théorique maximale standardisée pour l'Homme n'est pas encore fixée. A ce titre, l'évaluation de la toxicité des résidus détectés dans les pollens prélevés pour l'Homme n'a donc pas été réalisée dans notre étude.

5.4. Contamination multiple des matrices apicoles par les pesticides : quels effets potentiels sur les abeilles ?

La contamination importante des matrices apicoles par les pesticides est incontestable, qu'il s'agisse du nombre de molécules différentes retrouvées et des concentrations mesurées, indépendamment de la localisation géographique des ruchers suivis ([Annexe 2](#)). Nos résultats et ceux d'études précédentes en France ([Chauzat *et al.*, 2006](#) ; [Chauzat et Faucon, 2007](#) ; [Chauzat *et al.*, 2011](#)), en Espagne et au Portugal ([Blasco *et al.*, 2003](#)), en Italie ([Ghini *et al.*, 2004](#)), en Grèce ([Balayiannis et Balayiannis, 2008](#)), en Turquie ([Erdoğan, 2007](#)), aux Etats-Unis ([Mullin *et al.*, 2010](#)) et au Brésil ([Rissato *et al.*, 2007](#)) le montrent très nettement. Il apparaît également que plus le nombre de pesticides recherchés est élevé et que plus les limites de détection et de quantification sont basses, plus la contamination des matrices est importante. Dans l'étude de [Mullin *et al.* \(2010\)](#) en 2007 et 2008, sur une moyenne de 171 pesticides recherchés, 87, 98 et 46 ont été retrouvés respectivement dans les cires (99,6 % d'échantillons contenant au moins un pesticide), les pollens (99,1 % d'échantillons contenant au moins un pesticide) et les abeilles (91,4 % d'échantillons contenant au moins un pesticide). Notre étude plus récente (2008-2009) montre des chiffres plus proches de ceux de l'étude de [Chauzat *et al.* \(2011\)](#) entre 2002 et 2005, pour laquelle, 25/42 composés ont été détectés et/ou quantifiés dans les échantillons d'abeilles (44,3 % d'échantillons contenant au moins un pesticide), 22/41 dans le pollen (69,5 % d'échantillons contenant au moins un pesticide), 10/39 dans le miel (43,1 % d'échantillons contenant au moins un pesticide) et 15/18 dans les cires (64,9 % d'échantillons contenant au moins un pesticide). Toutefois, si les enquêtes de terrain avaient été réalisées en amont des analyses toxicologiques, permettant ainsi de cibler au mieux les pesticides utilisés sur les aires de butinage de chacun des ruchers, il est probable que nos résultats se seraient approchés de ceux de l'étude américaine.

Dans les échantillons de miel collectés lors de notre étude, 74 % des concentrations mesurées sont comprises entre la LOD et la LOQ, et lorsqu'elles sont quantifiées (26 %), ces concentrations sont généralement faibles. Dans la matrice pollen, 39 % des concentrations mesurées sont comprises entre la LOD et la LOQ, et les concentrations mesurées (61 %) sont parfois très élevées. La matrice abeilles présente le moins de valeurs quantifiées (16 %) mais les concentrations atteintes par certaines molécules peuvent être élevées et proches de la DL₅₀

abeille en particulier pour les insecticides et acaricides organophosphorés (chlorpyrifos, coumaphos, diazinon et phosmet). Actuellement, l'évaluation du risque posé par un pesticide est principalement basée sur la détermination de sa toxicité aiguë et donc de la DL₅₀ ; concernant l'abeille, cette approche est contestable dans la mesure où (i) seule la DL₅₀ sur l'abeille adulte est évaluée, (ii) le super-organisme représenté par la colonie n'est pas pris en compte et (iii) la toxicité chronique et les effets sublétaux ne sont pas considérés alors qu'ils concernent la majorité des molécules utilisées (Desneux *et al.*, 2007). En effet, à ces concentrations élevées qui peuvent entraîner des intoxications aiguës chez les abeilles des ruchers concernés, certaines molécules retrouvées à des concentrations plus faibles et supposées sans danger pour l'abeille peuvent être à l'origine de toxicité chronique et de troubles menaçant à terme le développement de la colonie. De nombreuses études en conditions de laboratoire ou semi-naturelles ont en effet clairement montré les effets sublétaux de certains pesticides sur les abeilles, même à faibles doses, impliquant notamment la diminution des fonctions cognitives et physiologiques ainsi que des troubles comportementaux (Belzunces *et al.*, 2012). Ainsi les pyréthriinoïdes (deltaméthrine), les néonicotinoïdes (imidaclopride, acetamipride, thiaméthoxame), les phényl-pyrazoles (fipronil) ou encore les organophosphorés (parathion, méthyl-parathion, ...) peuvent induire dans certaines conditions, (i) une réduction de la mémoire olfactive et des capacités d'apprentissage des butineuses en agissant notamment sur le réflexe d'extension du proboscis impliqué dans la communication chez les abeilles (Decourtye *et al.*, 2004a, 2004b, 2005 ; El Hassani *et al.*, 2008), (ii) une perturbation de la gustation et de l'olfaction en agissant sur les processus physiologiques du goût et de l'odorat (El Hassani *et al.*, 2008 ; Alioune *et al.*, 2009), (iii) une perturbation de la navigation et de l'orientation entraînant une diminution du nombre de vols de butinage, une augmentation des temps de vol de butinage ou de retour entre les ressources alimentaires et la ruche, ou encore une augmentation de la mortalité (Schricker et Stephen, 1970 ; Decourtye *et al.*, 2011 ; Henry *et al.*, 2012 ; Schneider *et al.*, 2012), (iv) des troubles de l'activité de butinage (Rieth et Levin, 1989 ; Colin *et al.*, 2004 ; Guez *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2008), et (v) des troubles de la thermorégulation et des contractions musculaires (Colin et Belzunces, 1992 ; Vandame et Belzunces, 1998).

En parallèle à une contamination extrinsèque importante par les pesticides d'usage agricole, les matrices apicoles sont également contaminées par les molécules utilisées au sein même de la ruche par les apiculteurs (Ghini *et al.*, 2004 ; Chauzat *et al.*, 2006 ; Chauzat et Faucon, 2007 ; Martel *et al.*, 2007 ; Frazier *et al.*, 2008 ; Bernal *et al.*, 2010 ; Higes *et al.*,

2010b ; Mullin *et al.*, 2010 ; Orantes-Bermejo *et al.*, 2010 ; Chauzat *et al.*, 2011). Cette contamination intrinsèque est importante dans la mesure où les molécules acaricides utilisées dans la lutte contre *Varroa destructor* sont toujours parmi les 5 molécules les plus fréquemment retrouvées quelle que soit la matrice considérée. Dans nos échantillons de miel, le coumaphos et l'amitrazé représentent 52 % de l'ensemble des détections et/ou quantifications, le tau-fluvalinate n'étant pas comptabilisé ici comme molécule d'usage apicole strict puisqu'il est également autorisé et utilisé en usage agricole comme l'ont montré les enquêtes réalisées autour des ruchers de l'étude. Le tau-fluvalinate apparaît comme la molécule la plus fréquemment retrouvée dans de nombreuses études étrangères (Bernal *et al.*, 2010 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Orantes-Bermejo *et al.*, 2010), cette tendance n'étant pas retrouvée dans nos échantillons bien que cette molécule ait été utilisée par plusieurs des apiculteurs partenaires. La contamination par les molécules d'usage apicole suscite de nombreuses interrogations et inquiétudes du fait (i) de sa prévalence élevée et de sa généralisation dans les différentes matrices, (ii) des résistances développées par *Varroa destructor* et liées à leur large utilisation (Elzen *et al.*, 2000 ; Pettis, 2004 ; Sammataro *et al.*, 2005 ; Maggi *et al.*, 2010), et (iii) de la toxicité avérée pour les abeilles de certaines de ces molécules induisant des perturbations des fonctions physiologiques (croissance, olfaction, reproduction, ...) (Wallner, 1999 ; Haarmann *et al.*, 2002 ; Weick et Thorn, 2002 ; Collins *et al.*, 2004 ; Pettis *et al.*, 2004 ; Burley *et al.*, 2008 ; Johnson *et al.*, 2009 ; Orantes-Bermejo *et al.*, 2010). La présence de coumaphos dans nos échantillons soulève de plus le problème des transferts de résidus des cires aux autres matrices apicoles. En effet, hormis un rucher dans lequel un usage illégal de coumaphos a été prouvé, cette molécule n'est plus utilisée par les apiculteurs de notre étude. Les concentrations dans nos échantillons d'abeilles, de miel et de pollen seraient liées à une utilisation ancienne importante de cette molécule (Perizin® en usage apicole puis Asuntol® en usage détourné), puis à une contamination et une accumulation dans les cires, et enfin à un transfert des cires recyclées aux matrices apicoles (Wallner, 1999 ; Wu *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2011) ont en effet confirmé le transfert de résidus de pesticides de cellules contaminées vers des cires nouvelles. Ils ont par ailleurs montré (i) une mortalité accrue du couvain élevé dans des cellules contaminées par des résidus recyclés d'acaricides, (ii) une croissance ralentie de ce couvain et une transformation en imago retardée, (iii) une longévité réduite des adultes exposés durant leur développement larvaire dans des cellules de couvain contaminées. Ce double phénomène d'accumulation puis de diffusion des cires vers les matrices apicoles est important et pourrait impliquer d'autres

molécules sans que l'on ne connaisse à l'heure actuelle son ampleur et l'impact réel sur la santé des colonies.

Cette charge importante en pesticides, d'usages agricoles et apicoles, soulève surtout le problème de l'association de molécules entre elles et de l'effet cocktail de cette association sur la santé des abeilles et de la colonie dans son ensemble.

Plusieurs études ont montré que la toxicité des pyréthrinoïdes et leurs effets sur la physiologie des abeilles étaient augmentés en présence de fongicides (Colin et Belzunces, 1992 ; Pilling et Jepson, 1993 ; Pilling *et al.*, 1995 ; Meled *et al.*, 1998 ; Vandame et Belzunces, 1998 ; Thompson et Wilkins, 2003). Ainsi, le prochloraz augmente la toxicité du lambda cyhalothrine de 6,7 fois et celle de l'alpha cyperméthrine de 2,2 (Thompson et Wilkins, 2003). L'association avec des fongicides (tels que le chlorothalonil, le tébuconazole ou le thiophanate-méthyl) réduit également le caractère répulsif des pyréthrinoïdes (λ -cyhalothrine et α -cyperméthrine), entraînant, d'une part une augmentation de l'exposition des abeilles à ces molécules, d'autre part une augmentation des risques liés aux effets synergiques entre ces deux types de pesticides (Thompson et Wilkins, 2003).

De même, l'interaction entre des fongicides et des acaricides utilisés dans la lutte contre *Varroa* a été démontrée : la toxicité du tau-fluvalinate augmente de 1000 fois chez des abeilles qui ont reçu préalablement du prochloraz, et celle du coumaphos de plus de 20 fois (Johnson, 2011). Les fongicides sont généralement considérés comme peu toxiques pour les abeilles et peuvent être appliqués sur les plantes en fleurs, par conséquent lorsque les abeilles butinent. La présence simultanée, récurrente et importante des fongicides et des acaricides dans les matrices apicoles (Mullin *et al.*, 2010 ; Lambert *et al.*, soumis) doit donc retenir toute l'attention comme source d'interactions entre ces molécules et d'effets néfastes potentiels sur les abeilles, et nécessite de plus amples recherches.

Compte tenu de la fréquence d'exposition des abeilles aux traitements anti-*Varroa*, quelques travaux ont étudié les effets des acaricides sur les abeilles. Les travaux de Johnson *et al.* (2009) montrent en particulier l'effet synergique des acaricides entre eux. Ainsi la toxicité du tau-fluvalinate peut être augmentée de plus de 2 à plus de 30 fois lors d'un pré-traitement avec 0,3 à 10 $\mu\text{g}/\text{abeille}$ de coumaphos. Johnson (2011) montre aussi que la toxicité du tau-fluvalinate est augmentée quel que soit l'acaricide employé en pré-traitement alors que celle de l'amitrazé n'augmente jamais, même si l'amitrazé peut rendre les autres acaricides plus toxiques. Ces interactions entre acaricides sont préoccupantes dans la mesure où des quantités déjà importantes de résidus sont retrouvées dans les cires, les abeilles étant exposées aux

acaricides anti-*Varroa* avant même les traitements effectifs. Ellis *et al.* (1997) ont cherché à déterminer si le tau-fluvalinate augmentait la vulnérabilité des abeilles à trois insecticides de familles de pesticides couramment utilisées en agriculture (un pyréthrianoïde, la bifenthrine, un carbamate, le carbaryl et un organophosphoré, le méthyl-parathion). Les abeilles traitées au tau-fluvalinate ont montré une sensibilité plus grande uniquement au pyréthrianoïde (toxicité de la bifenthrine augmentée de 1,9 fois). Si le recours aux acaricides dans la lutte contre *Varroa destructor* semble à l'heure actuelle difficilement contournable, les actions synergiques des acaricides entre eux et avec d'autres molécules doivent amener les apiculteurs à les utiliser avec précaution en ayant une bonne connaissance de la qualité des cires utilisées et en travaillant en concertation avec les agriculteurs pour éviter tant que possible les traitements simultanés.

La contamination des matrices apicoles par les pesticides est encore actuellement très importante, tant en matière de quantité et de variété des molécules retrouvées qu'en matière de concentrations déterminées. Même si de nombreux travaux pour en évaluer les effets existent, il est essentiel que de nouveaux programmes émergent : (i) pour étudier les effets d'un plus grand nombre de molécules, (ii) pour substituer aux essais de toxicité aiguë (évaluation de la DL_{50}), des essais de toxicité subchronique et chronique plus pertinents pour évaluer les effets létaux et non létaux des molécules sur l'abeille et la colonie dans son ensemble, (iii) pour se rapprocher des conditions de terrain en réalisant des études en plein-champ, encore très rares aujourd'hui (Henry *et al.*, 2012), (iv) pour généraliser les études sur la potentialisation des effets de ce cocktail de molécules, de plus en plus incriminé dans les pertes récentes de colonies.

5.5. Contaminations chimiques et biologiques importantes : quelles implications sur la santé des abeilles ?

Les parasites et autres agents infectieux représentent un facteur naturel de stress qui influence les populations en agissant sur la physiologie et le métabolisme des individus, et en modifiant les traits d'histoire de vie tels que la survie, le développement ou la fécondité. D'autres facteurs de stress, et plus particulièrement les polluants environnementaux, peuvent exacerber leurs effets négatifs (Holmstrup *et al.*, 2010). De nombreuses études ont montré l'implication des agents infectieux dans les troubles du développement, les perturbations physiologiques des abeilles voire l'effondrement des colonies (Berényi *et al.*, 2006 ; Cox-Foster *et al.*, 2007 ; Faucon et Chauzat, 2008 ; Le Conte et Navajas, 2008 ; vanEngelsdorp *et al.*, 2009 ; Ellis *et al.*, 2010), pendant que d'autres ont décrit la contamination élevée des matrices apicoles par les pesticides et leurs effets sur les abeilles (voir partie 5.4.). A notre connaissance, excepté le programme récent de suivi de la santé de l'abeille en Allemagne (Genersh *et al.*, 2010), aucune étude de terrain n'a montré à la fois la forte prévalence des agents infectieux sur des colonies *a priori* saines et la contamination simultanée par les agents infectieux et les pesticides.

En parallèle des analyses toxicologiques réalisées dans le cadre de notre étude (Wiest *et al.*, 2011 ; Lambert *et al.*, soumis), des prélèvements d'abeilles ont été effectués dans les dix-huit ruchers suivis pour évaluer le portage asymptomatique ou symptomatique de douze agents infectieux par les colonies (Mouret *et al.*, soumis : Annexe 6) : les bactéries *Paenibacillus larvae* (agent de la loque américaine) et *Melissococcus plutonius* (agent de la loque européenne), deux champignons parasites (microsporidies), *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, les virus ABPV (Acute Bee Paralysis Virus ou virus de la paralysie aiguë), IAPV (Israeli Acute Paralysis ou virus de la paralysie aiguë variant israélien), KBV (Kashmir Bee Virus ou virus de Cachemire), BQCV (Black Queen Cell Virus ou virus de la cellule noire de reine), CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus ou virus de la paralysie chronique ou maladie noire), DWV (Deformed Wing Virus ou virus des ailes déformées), SBV (Sacbrood Bee Virus responsable de la maladie du couvain sacciforme) et VdV1 (*Varroa Destructor* Virus 1). Les résultats montrent que *N. ceranae* et DWV sont présents dans 75 % des colonies, *P. larvae* dans 65 % des colonies, BQCV, CBPV, KBV, SBV et VdV1 dans 50 % des colonies,

M. plutonius et IAPv dans 25 % des colonies, et *N. apis* et ABPV dans moins de 5 % des colonies. En moyenne, plus de 5 agents infectieux sont retrouvés par colonie et 9 par rucher. Les ruchers apparaissent donc comme des foyers d'infection importants, le comportement de l'abeille et les techniques apicoles pouvant favoriser ou limiter l'extension des agents infectieux d'une colonie à l'autre, au sein d'un même rucher voire même entre les ruchers (Fries et Camazine, 2001 ; Evans et Spivak, 2010). En effet, le comportement de pillage et la dérive chez les abeilles peuvent être à l'origine de contamination d'une colonie à l'autre ; inversement, le comportement hygiénique ou la sortie prématurée de la ruche d'abeilles précocement infectées par *Nosema* ou le Sacbrood Bee Virus (SBV) réduisent le taux de transmission de l'agent infectieux au sein même de la colonie (Hassanein, 1953 ; Bailey et Fernando, 1972, Evans et Spivak, 2010). La plupart des ruchers de notre étude sont caractérisés par un portage asymptomatique d'agents potentiellement infectieux, un équilibre s'étant vraisemblablement installé entre les abeilles et ces agents infectieux. Cet équilibre est toutefois particulièrement fragile et l'apport de souches exogènes d'agents infectieux ou d'autres facteurs de stress pourrait déclencher l'apparition de signes cliniques spécifiques de la maladie (Alippi *et al.*, 2004) et de troubles dans la colonie.

L'ensemble de nos résultats confirme donc que les abeilles sont exposées simultanément à une contamination biologique et chimique importante, et peuvent potentiellement subir les effets d'agents infectieux, de pesticides et de leurs interactions. Des travaux récents mettent ainsi en évidence les effets synergiques des agents infectieux et des pesticides et leurs implications dans la santé de l'abeille et des colonies (Alaux *et al.*, 2010a ; Vidau *et al.*, 2011 ; Aufauvre *et al.*, 2012 ; Pettis *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2012). Cette série de travaux contraste avec les rares études menées sur ce sujet jusqu'alors (Bendahou *et al.*, 1997) soulignant les enjeux actuels liés à la compréhension de ces interactions. Alaux *et al.* (2010a) ont montré que des abeilles infectées par *Nosema* et exposées à de l'imidaclopride (néonicotinoïde), à des concentrations retrouvées dans l'environnement, présentaient des taux de mortalité plus élevés et consommaient plus de sucres. Ainsi, bien que le niveau de contamination par l'imidaclopride des abeilles soit généralement faible et à des concentrations sublétales, l'infection par *Nosema* entraînerait une exposition des abeilles à des doses létales en augmentant la consommation de nourriture contaminée. Vidau *et al.* (2011) ont trouvé des résultats comparables et ont montré que des doses sublétales de thiaclopride (néonicotinoïde) et de fipronil (phénylpyrazole) augmentent la mortalité des abeilles infectées par *Nosema ceranae*, même si les deux insecticides n'ont pas la même incidence sur la production de spores par les microsporidies (la production augmente de 40 % avec une exposition au

thiaclopride et diminue de 33% avec une exposition au fipronil). Contrairement à l'étude de [Alaux et al. \(2010a\)](#), l'effet synergique démontré par [Vidau et al. \(2011\)](#) ne serait pas lié dans ce cas à une augmentation de prise de nourriture. Ces différences démontrent qu'une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans la co-contamination par de faibles doses d'insecticides et par un agent infectieux est nécessaire pour appréhender au mieux les effets synergiques observés et leurs implications dans les mortalités d'abeilles. Les résultats des études très récentes de [Aufauvre et al. \(2012\)](#) et de [Pettis et al. \(2012\)](#) sont similaires aux deux précédentes études avec la mise en évidence d'une action synergique entre *Nosema* et le fipronil, et entre *Nosema* et l'imidaclopride. [Pettis et al. \(2012\)](#) montrent toutefois que si l'infection par *Nosema* augmente significativement lorsque les colonies sont exposées à de faibles doses d'imidaclopride, la production de spores n'augmente pas à l'échelle de la colonie. Les auteurs soulignent ainsi le fait que la production de spores ne serait pas le moyen approprié pour mesurer l'infection par *Nosema*. Ce résultat pourrait notamment expliquer ceux de notre étude, et en particulier le fait que des colonies puissent présenter un nombre important de spores de *Nosema ceranae* sans développer la maladie alors que d'autres présentant un nombre bien inférieur de spores puissent la développer. Les conclusions de ces trois études peuvent également laisser supposer que la présence de pesticides pourrait être un facteur influençant le portage asymptomatique ou symptomatique d'agents infectieux. Les travaux de [Wu et al. \(2012\)](#) montrent que des abeilles exposées durant leur développement à des concentrations élevées de pesticides étaient infectées plus précocement par *Nosema ceranae* que des abeilles non exposées. Cet effet en fonction de l'âge des abeilles a été par ailleurs démontré par [Aufauvre et al. \(2012\)](#) : l'effet synergique de ces deux stressseurs, agent chimique et agent biologique, est plus important lorsque les abeilles sont exposées tôt dans leur développement quelque soit l'ordre chronologique d'exposition aux stressseurs. Ces deux études témoignent ainsi du risque important lié à une exposition chronique à ces pesticides pour les colonies d'abeilles.

Les résultats de ces travaux récents sur les interactions entre de faibles doses de pesticides et d'agents infectieux ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mortalités qui touchent actuellement les abeilles à travers le monde. Ces interactions subtiles n'ont été démontrées pour le moment que pour les agents de la nosérose et deux familles d'insecticides, et les travaux mériteraient d'être élargis à d'autres pesticides et agents infectieux si l'on considère l'exposition élevée des abeilles à ces stressseurs environnementaux tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

5.6. Conclusion et perspectives

L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*), le miel et le pollen peuvent être utilisés comme des sentinelles de la contamination environnementale par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), le plomb, les pesticides et les médicaments vétérinaires. Les résultats d'analyses toxicologiques ont souligné des sensibilités différentes en fonction du polluant environnemental, de la matrice étudiée (le miel pouvant être considéré comme la matrice apicole la moins contaminée), de la période de prélèvements et du contexte paysager. En dépit de ces différences, le plus souvent propres à chaque rucher, notre étude montre une contamination généralisée des matrices apicoles quels que soient le paysage et la période considérés.

La contamination des matrices apicoles par les HAPs correspond à une contamination de fond dominée par des concentrations faibles, et marquée par quelques pics ponctuels de concentrations élevées liées au contexte environnemental du rucher. Nos résultats font par ailleurs le lien entre le degré d'anthropisation et la contamination par les HAPs, ce qui est confirmé par la bibliographie, même si notre faible nombre de ruchers et de prélèvements apporte quelques nuances. Enfin, les analyses montrent que la contamination est dominée par les HAPs à faible poids moléculaire, lesquels seraient donc à privilégier lors d'une évaluation de la contamination environnementale par les HAPs et utilisant les matrices apicoles.

Les profils de contamination des abeilles, du miel et du pollen par le plomb sont liés à la fois au contexte paysager et à la période de prélèvements. La contamination des matrices apicoles dépendrait en effet de la proximité du rucher avec des sources polluantes anthropiques tels que les zones industrialisées ou les axes routiers, et serait plus élevée lors des périodes sèches, la présence du plomb dans l'atmosphère étant favorisée durant ces périodes.

L'analyse multi-résidus réalisée dans le cadre de ce travail montre le nombre important de résidus de traitements vétérinaires, agricoles et de jardinage retrouvés dans les matrices apicoles, ce nombre ne représentant pourtant qu'un faible échantillon du nombre de molécules réellement utilisées dans et autour des ruchers. Même si les concentrations retrouvées sont généralement faibles (comprises entre la LOD et la LOQ dont les valeurs sont notamment conditionnées par la méthode d'analyse utilisée), elles ne doivent pas masquer les

risques pour l'abeille et la colonie en général dans la mesure où (i) de nombreuses études montrent les effets des pesticides même à de très faibles doses, (ii) des concentrations très élevées dans les abeilles sont également déterminées, (iii) les effets cocktails entre pesticides sont démontrés et concernent des molécules fréquemment retrouvées dans les matrices apicoles, (iv) la pression pathogène induite par les agents infectieux est importante, d'autant que les interactions et effets synergiques des pesticides et des agents infectieux sont également prouvés, (v) d'autres stressseurs environnementaux peuvent s'ajouter (vanEngelsdorp et Meixner, 2010) tels que la multiplication des plantes transgéniques, même si à l'heure actuelle, aucun impact négatif n'a été démontré chez l'abeille (Malone et Pham-Delègue, 2001 ; Babendreier *et al.*, 2005 ; Rose *et al.*, 2007), l'arrivée de nouveaux prédateurs (Perrard *et al.*, 2009), les conditions météorologiques et le climat (Le Conte et Navajas, 2008), les pratiques apicoles ou la modification des paysages, (vi) la variabilité génétique peut intervenir comme facteur de résistance (Tarpy, 2003 ; Graham *et al.*, 2006 ; Mattila et Seeley, 2007).

L'ensemble de ces travaux réalisés et à venir sur l'Abeille mellifère sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués dans les mortalités massives d'abeilles domestiques et pour y répondre au plus vite avec efficacité. Dans un souci environnemental et parce que la communauté entière des pollinisateurs est essentielle au maintien des écosystèmes (Goulson, 2003b ; Klein *et al.*, 2007 ; Holzschuh *et al.*, 2012), il semble urgent de généraliser les études sur les espèces sauvages également. En effet de nombreuses études montrent que les abeilles sauvages connaissent également un déclin important (Kosior *et al.*, 2007 ; Goulson *et al.*, 2008 ; Williams et Osborne, 2009 ; Potts *et al.*, 2010a). Ce déclin serait très vraisemblablement lié à la même cause multifactorielle que pour *Apis mellifera* mais pourrait aussi être en partie attribué à la compétition importante avec l'abeille domestique (Batra, 1995 ; Steffan-Dewenter et Tschardt, 2000 ; Goulson, 2003a, Thomson, 2004). Des travaux récents mettent en évidence des sensibilités similaires à la fragmentation des paysages (Öckinger et Smith, 2007 ; Rundlöf *et al.*, 2008), aux pesticides et aux agents infectieux et laissent présager les mêmes effets de synergie mais le travail à accomplir sur ces espèces n'en est encore qu'à ses prémises (Genersch *et al.*, 2006 ; Otti et Schmid-Hempel, 2007 ; Plischuk *et al.*, 2009 ; Brittain *et al.*, 2010, Whitehorn *et al.*, 2012).

A soft-focus photograph of a bee in flight over a branch of pink cherry blossoms. The bee is positioned in the upper center, with its wings spread. Below it, a cluster of light pink flowers is visible, including one fully open flower with prominent stamens and several buds. The background is a pale, hazy grey, creating a dreamy atmosphere.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achudume, A.C., Nwafor, B.N., 2010. The ecological assessment of metals in local brands of honey in Southwest Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* 5, 2608–2610.
- Agger, P., Brandt, J., 1988. Dynamics of small biotopes in Danish agricultural landscapes. *Landscapes Ecology* 1, 227–240.
- Air Pays de la Loire, 2003. Premières mesures exploratoires de produits phytosanitaires dans l’atmosphère des Pays de la Loire, résultats des campagnes 2002. Rapport Air Pays de la Loire du 26 mars 2003, 64p.
- Air Pays de la Loire, 2008. Mesures de produits phytosanitaires dans l’air en zone arboricole et en milieu urbain, campagne de mesure printemps-été 2007. Rapport Air Pays de la Loire d’avril 2008, version 2, 36p.
- Aksoy, A., Öztürk, M.A., 1997. *Nerium oleander* L. as biomonitor of lead and other heavy metal pollution in Mediterranean environments. *Science of the Total Environment* 205, 145–150.
- Alaux, C., Brunet, J-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchian, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010a. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 12, 774–782.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010b. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6, 562–565.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B., 2006. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC–Ms or LC–MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews* 25, 838–865.
- Alioune, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 113–122.
- Alippi, A.M., Reynaldi, F.J., López, A.C., De Giusti, M.R., Mario Aguilar, O., 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. *Journal of Apicultural Research* 43, 135–143.
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplona, L.C., Coimbra, S., Barth, O.M., 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 105–111.

- Al-Shayeb, S.M., Al-Rajhi, M.A., Seaward, M.R.D., 1995. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) as a biomonitor of lead and other elements in arid environments. *Science of the Total Environment* 168, 1–10.
- Amiard, J-C., 2011. Les risques chimiques environnementaux : méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier, Editions Tec & Doc, Paris, France, 782p.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86, 412–431.
- Anastassiades, M., Maštovská, K., Lehotay, S.J., 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 1015, 163–184.
- Anderson, L.D., Atkins Jr, E.L., 1968. Pesticide usage in relation to beekeeping. *Annual Review of Entomology* 13, 231–238.
- Aruga, R., 1997. Treatment of responses below the detection limit: some current techniques compared by Factor Analysis on environmental data. *Analytica Chimica Acta* 354, 255–262.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., Blot, N., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports* 2 (326), 1–7.
- Azimi, S., Rocher, V., Muller, M., Moilleron, R., Thévenot, D.R., 2005. Sources, distribution and variability of hydrocarbons and metals in atmospheric deposition in an urban area (Paris, France). *Science of the Total Environment* 337, 223–239.

B

- Babendreier, D., Kalberer, N.M., Romeis, J., Fluri, P., Mulligan, E., Bigler, F., 2005. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 36, 585–594.
- Bagley G.E., Locke, L.N., 1967. The occurrence of lead in tissues of wild birds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2, 297–305.
- Bailey, L., Fernando, E., 1972. Effects of sacbrood virus on adult honey-bees. *Annals of Applied Biology* 72, 27–35.

- Baker, R.A., Chmielewski, W., 2003. How old are bees? A look at the fossil record. *Journal of Apicultural Science* 47, 79–85.
- Balayiannis, G., Balayiannis, P., 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 462–470.
- Barak, N.A-E., Mason, C.F., 1990. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from eastern England. *Science of the Total Environment* 92, 257–263.
- Barakat, A.A., Badawy, H.M.A., Salama, E., Attallah, E., Maatook, G., 2007. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. *Journal of Food Agriculture and Environment* 5, 97–100.
- Barganska, Z., Namieśnik, J., 2010. Pesticide analysis of bee and bee product samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 40, 159–171.
- Barker, R.J., Lehner, Y., Kunzmann, M.R., 1980. Pesticides and honey bees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethoate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 9, 125–133.
- Barmaz, S., Potts, S.G., Vighi, M., 2010. A novel method for assessing risks to pollinators from plant protection products using honeybees as a model species. *Ecotoxicology* 19, 1347–1359.
- Barnett, E.A., Charlton, A.J., Fletcher, M.R., 2007. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994-2003. *Pest Management Science* 63, 1051–1057.
- Baroni, M.V., Arrua, C., Nores, M.L., Faye, P., Del Pilar Diaz, M., Chiabrande, G.A., Wunderlin, D.A., 2009. Composition of honey from Cordoba (Argentina): assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry* 114, 727–733.
- Basu, N., Scheuhammer, A.M., Bursian, S.J., Elliott, J., Rouvinen-Watt, K., Chan, H.M., 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research* 103, 130–144.
- Batra, S.W.T., 1995. Bees and pollination in our changing environment. *Apidologie* 26, 361–370.
- Beekman, M., Ratnieks, F.L.W., 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L.. *Functional Ecology*. 14, 490–496.
- Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., Brunet, J-L., 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43, 348–370.

- Bendahou, N., Bounias, M., Fleche, C., 1997. Acute toxicity of cypermethrin and fenitrothion on honeybees (*Apis mellifera mellifera*) according to age, formulations and (chronic paralysis virus)/insecticide interaction. *Journal of Environmental Biology* 18, 55–65.
- Benton, T.G., Vickery, J.A., Wilson, J.D., 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology and Evolution* 18, 182–188.
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., Nowotny, N., 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2414–2420.
- Bernal, J., Garrido-Bailón, E., Del Nozal, M.J., González-Porto, A.V., Martín-Hernández R., Diego, J.C., Jiménez, J.J., Bernal J.L., Higes, M., 2010. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology* 103, 1964–1971.
- Bernard, J-L., Havet, P., Fort, M., 2007. *Productions végétales, pratiques agricoles et faune sauvage*. Editeur ACTA, Paris, France, 251p.
- Beynon, S.A., 2012. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Veterinary Parasitology In Press*, available online 24 March 2012.
- Bibi, S., Zahoor Husain, S., Naseem Malik, R., 2008. Pollen analysis and heavy metals detection in honey samples from seven selected countries. *Pakistan Journal of Botany* 40, 507–516.
- Bilandžić, N., Đokić, M., Sedak, M., Kolanović, B.S., Varenina, I., Končurat, A., Rudan, N., 2011. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chemistry* 128, 1160–1164.
- Blasco, C., Fernández, M., Pnea, A., Lino, C., Silveira, M^aI., Font, G., Picó, Y., 2003. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 51, 8132–8138.
- Blus, L.J., Henny, C.J., Mulhern, B.M., 1987. Concentrations of metals in mink and other mammals from Washington and Idaho. *Environmental Pollution* 44, 307–318.
- Boff, S., Luz, C.F.P., Araujo, A.C., Pott, A., 2011. Pollen analysis reveals plants foraged by Africanized honeybees in the Southern Pantanal, Brazil. *Neotropical Entomology* 40, 47–54.
- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1–18.
- Bonmatin, J-M., 2002. Insecticide et pollinisateurs : une dérive de la chimie ? *Sciences* 2, 42–46.

- Brittain, C.A., Vighi, M., Bommarco, R., Setteled, J., Potts, S.G., 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology* 11, 106–115.
- Bromenshenk, J.J., Carlson, S.R., Simpson, J.C., Thomas, J.M., 1985. Pollution monitoring of Puget Sound with honey bees. *Science* 8, 632–634.
- Bruneau, E., Colin, M-E., 2006. Clefs pour l'alimentation de l'abeille (2) – stratégie d'approvisionnement. *Abeilles & Compagnie* 114, 18–21.
- Bruneau, E., Burget, M., 2008. Le dépérissement en Europe et aux Etats-Unis, des approches différentes. *Abeilles & Compagnie* 127, 25–29.
- Brunet, N., Guichard, L., Omon, B., Pingault, N., Pleyber, E., Seiler, A., 2008. L'indicateur de fréquence de traitements (IFT) : un indicateur pour une utilisation durable des pesticides. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* 56, 131-141.
- Buchmann, S.L., Shipman, C.W., 1991. Foraging distances flown by honey bee colonies: analyses using mathematica software. *American Bee Journal* 131, 771.
- Buekers, J., Steen Redeker, E., Smolders, E., 2009. Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Science of the Total Environment* 407, 3431–3438.
- Burel, F., Baudry, J., 1990. Structural dynamic of a hedgerow network landscape in Brittany, France. *Landscape Ecology* 4, 197–210.
- Burel, F., Baudry, J., 1999. *Ecologie du paysage, concepts, méthodes et application*. Editions Lavoisier Tec & Doc, Paris, France, 359 p.
- Burley, L.M., Fell, R.D., Saacke, R.G., 2008. Survival of honey bee (Hymenoptera: *Apidae*) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *Journal of Economic Entomology* 101, 1081–1087.
- Busby, D.G., Pearce, P.A., Garrity, N.R., Reynolds, L.M., 1983. Effect of an organophosphorus insecticide on brain cholinesterase activity in white-throated sparrows exposed to aerial forest spraying. *Journal of Applied Ecology* 20, 255–263.
- Butault, J-P., Delame, N., Jacquet, F., Zardet, G., 2011. L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction. Centre d'Etudes et de Prospective, Service de la Statistique et de la Prospective, Notes et études socio-économiques 35, 7–26.

Butler, S.J., Boccaccio, L., Gregory, R.D., Vorisek, P., Norris, K., 2010. Quantifying the impact of land-use change to European farmland bird populations. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 137, 348–357.

C

Čajka, T., Hajšlová, J., 2004. Gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: advantages and limitations. *Journal of Chromatography A* 1058, 251–261.

Carvell, C., Meek, W.R., Pywell, R.F., Goulson, D., Nowakowski, M., 2007. Comparing the efficacy of agri-environment schemes to enhance bumble bee abundance and diversity on arable field margins. *Journal of Applied Ecology* 44, 29–40.

Celli, G., Maccagnani, B., 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56, 137–139.

Cesco, S., Barbattini, R., Agabiti, M.F., 1994. Honey bees and bee products as possible indicators of cadmium and lead environmental pollution: an experience of biological monitoring in Portogruaro city (Venice, Italy). *Apicoltura* 9, 103–118.

Charlton, A.J.A., Jones, A., 2007. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1141, 117–122.

Charvet, R., Katouzian-Safadi, M., Colin, M-E., Marchand, P-A., Bonmatin, J-M., 2004. Insecticides systémiques : de nouveaux risques pour les insectes pollinisateurs. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 62, 29–35.

Chauzat, M-P., Faucon, J-P., Martel, A-C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology* 99, 253–262.

Chauzat, M-P., Faucon, J-P., 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* 63, 1100–1106.

Chauzat, M-P., Martel, A-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J-P., 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 103–111.

- Chaves, A., Shea, D., Danehower, D., 2008. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. *Chemosphere* 71, 629–638.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S., 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 101, 204–209.
- Clark, D.R., 1981. Death in bats from DDE, DDT or dieldrin: diagnosis *via* residues in carcass fat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26, 367–374.
- Clément, H., & collaborateurs, 2006. Le traité rustica de l'apiculture. Rustica Editions, Paris, deuxième édition juillet 2006, 528p.
- Codreanu, I., Sfetcu, I., Codreanu, M., Goran, G., 2009a. Correlation between the lead residues in honey bees and the apiary location. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, XLII, 301–305.
- Codreanu, I., Sfetcu, I., Codreanu, M., Goran, G., 2009b. Investigations concerning the lead residues in apiary products (honey wax). *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, XLII, 306–309.
- Colin, M-E., Belzunces, L.P., 1992. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L. – A convenient biological approach. *Pesticide Science* 36, 115–119.
- Colin, M-E., Bonmatin, J-M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., Vermandere, J.P., 2004. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 387–395.
- Collins, A.M., Pettis, J.S., Wilbanks, R., Feldlaufer, M.F., 2004. Performance of honey bee (*Apis mellifera*) queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos. *Journal of Apicultural Research* 43, 128–134.
- Commission Regulation (EC) No. 108, 2005. Official Journal of the European Communities, 2005, L34, 43–45.
- Conti, M.E., Botrè, F., 2001. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* 69, 267–282.
- Core, A., Runckel, C., Ivers, J., Quock, C., Siapno, T., DeNault, S., Brown, B., DeRisi, J., Smith, C.D., Hafernik, J., 2012. A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*. *PLoS ONE* 7, e29639.

- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
- Cozmuta, A.M., Bretan, L., Cozmuta, L.M., Nicula, C., Peter, A., 2012. Lead traceability along soil-melliferous flora-bee family-apiary products chain. *Journal of Environmental Monitoring* 15, 1622–1630.
- Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schöffmann, B., 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* 38, 409–419.
- Crane, E., Walker, P., 1983. The impact of pest management on bees and pollination. *Tropical Development and Research Institute, London, 1983, 232p.*
- Crépineau-Ducoulombier, C., Rychen, G., 2003. Assessment of soil and grass Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) contamination levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23, 345–348.
- Crowl, T.A., Crist, T.O., Parmenter, R.R., Belovsky, G., Lugo, A.E., 2008. The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6, 238–246.

D

- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., Speare, R., 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* 5, 735–748.
- Debayle, D., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F., 2008. Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 1011–1020.
- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., Pham-Delègue, M-H., 2004a. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 78, 83–92.

- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M-H., 2004b. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 410–419.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., Pham-Delègue, M.H., 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 242–250.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourrier, J., Gauthier, M., 2011. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20, 429–437.
- de la Rúa, P., Galián, J., Serrano, J., Moritz, R.F.A., 2001. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). *Apidologie* 32, 417–427.
- de la Rúa, P., Jaffé, R., Dall’Olio, R., Muñoz, I., Serrano, J., 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie* 40, 263–284.
- de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010. The acute bee paralysis – Kashmir bee virus – Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S30–S47.
- de Miranda, J.R., Genersch, E., 2010. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S48–S61.
- Demayo, A., Taylor, M.C., Taylor, K.W., Hodson, P.V., Hammond, P.B., 1982. Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 12, 257–305.
- Deruelle, S., 1996. The reliability of lichens as biomonitors of lead pollution. *Ecologie* 27, 285–290.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81–106.
- Devillers, J., Pham-Delègue, M.H., 2002. Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. Editeurs Taylors & Francis, Philadelphia, USA, 332p.
- Devillers, J., & collaborateurs, 2005. Utilisation de l’Abeille domestique (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l’environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydrophobe. Programme PNETOX 2001, rapport final 2005, 1–89.
- Dietz, R., Riget, F., Johansen, P., 1996. Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals. *Science of the Total Environment* 186, 67–93.

- Díez, C, Traag, W.A., Zommer, P., Marinero, P., Atienza, J., 2006. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley. *Journal of Chromatography A* 1131, 11–23.
- Dobrinas, S., Birghila, S., Coatu, V., 2008. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 71–77.
- Dolédec, S., Chessel, D., 1994. Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology* 31, 277–294.
- Dong, T.T.T., Lee, B-K., 2009. Characteristics, toxicity, and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in road dust of Ulsan, Korea. *Chemosphere* 74, 1245–1253.
- Doornaert, B., Pichard, A., 2003. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérogènes : approches substance par substance (facteurs d'équivalence toxique – FET) et approche par mélanges, évaluation de la dose-réponse pour des effets non cancérogènes : valeurs toxicologiques de référence (VTR). Rapport INERISDRC-03-47026-ETSC, 64p.
- Drasch, G.A., Walser, D., Kösters, J., 1987. The urban pigeon (*Columba livia, forma urbana*) – a biomonitor for the lead burden of the environment. *Environmental Monitoring and Assessment* 9, 223–232.
- Dray, S., Chessel, D., Thioulouse, J., 2003. Procrustean co-inertia analysis for the linking of multivariate datasets. *Ecoscience* 73, 1–6.

E

- EC (European Commission), 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food.
- EFSA, 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in food chain. *The EFSA Journal* 724, 1–114.
- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gauthier, M., Armengaud, C., 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 82, 30–39.

- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., Armengaud, C., 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54, 653–661.
- Elliott, J.E., Bishop, C.A., Morrissey, C.A., 2011. Wildlife Ecotoxicology, forensic approaches. Editions Springer, New York, 466 p.
- Ellis, M.D., Siegfried, B.D., Spawn, B., 1997. The effect of Apistan® on honey bee (*Apis mellifera* L): response to methyl parathion, carbaryl and bifenthrin exposure. Apidologie 28, 123–127.
- Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J., 2010. Colony losses, managed colony population decline and Colony Collapse Disorder in the United States. Journal of Apicultural Research 49, 134–136.
- Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.T., 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. Resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. Apidologie 31, 437–441.
- Enderson, J.H., Berger, D.D., 1968. Chlorinated hydrocarbon residues in peregrines and their prey species from Northern Canada. The Condor 70, 149–153.
- Engel, M.S., 2006. A giant honey bee from the middle Miocene of Japan (Hymenoptera: *Apidae*). American Museum Novitates 3504, 12p.
- Engel, M.S., Hinolosa-Díaz, I.A., Rasnitsyn, A.P., 2009. A honey bee from the Miocene of Nevada and the biogeography of *Apis* (Hymenoptera: *Apidae*: *Apini*). Proceedings of the California Academy of Sciences 60, 23–38.
- Erdoğan, Ö., 2007. Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaraş, Turkey. Food Control 18, 866–871.
- Eremia, N., Dabija, T., Dodon, I., 2010. Study of dynamics of heavy metals in soil, plants, bee products and bee body. Bulletin UASVM, Animal Science and Biotechnologies 67, 183–187.
- European Commission, EU Pesticides Database of MRLs, Regulation (EC) No.396/2005, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1991. Quantitative analysis of lipids and protein from the pollen of *Brassica napus* L. Plant Science 73, 117–126.
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology 103, S62–S72.

- Fakhimzadeh, K., Lodenius, M., (2000). Heavy metals in Finnish honey, pollen and honey bees. *Apiacta* 35, 85–95.
- Faucon, J.P., Chauzat, M-P., 2008. Varroase et autres maladies des abeilles : causes majeures de mortalité des colonies en France. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 161, 257–263.
- Field, M.S., 2011. Application of robust statistical methods to background tracer data characterized by outliers and left-censored data. *Water Research* 45, 3107–3118.
- Fisher, I.J., Pain, D.J., Thomas, V.G., 2006. A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological Conservation* 131, 421–432.
- Fismes, J., Perrin-Ganier, C., Empereur-Bissonnet, P., Morel, J.L., 2002. Soil to root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 31, 1649–1656.
- Flegal, A.R., Smith, D.R., 1995. Measurements of environmental lead contamination and human exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 143, 1–45.
- Floate, K.D., 2006. Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research* 70, 1–10.
- Floate, K.D., Wardhaugh, K.G., Boxall, A.B.A., Sherratt, T.N., 2005. Fecal residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in the pasture environment. *Annual Review of Entomology* 50, 153–179.
- Forsgren, E., 2010. European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S5–S9.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J-M., 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* 31, 167–180.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B.P., Hepburn, H.R., Solignac, M., Cornuet, J-M., 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86, 420–430.
- Frazier, M., Mullin, C., Frazier, J., Ashcraft, S., 2008. What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal* 148, 521–523.
- Fredes, C., Montenegro, G., 2006. Heavy metals and other trace elements contents in Chilean honey. *Ciencia e Investigación Agraria* 33, 50–58.

- Free, J.B., Williams, I.H., Pinsent, R.J.F.H., Townsend, A., Basi, M.S., Graham, C.L., 1983. Using foraging honeybees to sample an area for trace metals. *Environment International* 9, 9–12.
- Freemark, K., Boutin, C., 1995. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 52, 67–91.
- Frias, I., Rubio, C., Gonzáles-Iglesias, T., Gutiérrez, A.J., Gonzáles-Weller, D., Hardisson, A., 2008. Metals in fresh honeys from Tenerife island, Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 30–33.
- Fries, I., Camazine, S., 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* 32, 1–16.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S73–S79.

G

- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68, 810–821.
- Garban, B., Blanchoud, H., Motelay-Massei, A., Chevreuril, M., Ollivon, D., 2002. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment* 36, 5395–5403.
- García-Chao, M., Agruña, M.J., Calvete, G.F., Sakkas, V., Llompart, M. Dagnac, T., 2010. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta* 672, 107–113.
- Garnery, L., Cornuet, J-M., Solignac, M., 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 1, 145–154.
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I., de Miranda, J.R., 2006. Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* 91, 61–63.

- Genersch, E., Von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Böhler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332–352.
- Genersch, E., 2010. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S10–S19.
- Ghini, S., Fernández, M., Picó, Y., Marín, R., Fini, F., Mañes, J., Girotti, S., 2004. Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 479–488.
- Glennemeier, K.A., Denver, R.J., 2001. Sublethal effects of chronic exposure to an organochlorine compound on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Environmental Toxicology* 16, 287–297.
- Goulson, D., 2003a. Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34, 1–26.
- Goulson, D., 2003b. Conserving wild bees for crop pollination. *Food, Agriculture and Environment* 1, 142–144.
- Goulson, D., Lye, G.C., Darvill, B., 2008. Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* 53, 191–208.
- Graham, S., Myerscough, M.R., Jones, J.C., Oldroyd, B.P., 2006. Modelling the role of intracolony genetic diversity on regulation of brood temperature in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Insectes Sociaux* 53, 226–232.
- Grasman, K.A., Scanlon, P.F., Fox, G.A., 1998. Reproductive and physiological effects of environmental contaminants in fish-eating birds of the Great Lake: a review of historical trends. *Environmental Monitoring and Assessment* 53, 117–145.
- Greig-Smith, P.W., Thompson, H.M., Hardy, A.R., Bews, M.H., Findlay, E., Stevenson, J.H., 1994. Incidents of poisoning of honeybees (*Apis mellifera*) by agricultural pesticides in Great Britain 1981-1991. *Crop Protection* 13, 567–581.
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678–690.

- Gross, S.B., Pfitzer, E.A., Yeager, D.W., Kehoe, R.A., 1975. Lead in human tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 32, 638–651.
- Gross, C.L., Mackay, D., 1998. Honeybees reduce fitness in the pioneer shrub *Melastoma affine* (*Melastomataceae*). *Biological Conservation* 86, 169–178.
- Guez, D., Zhang, S.W., Srinivasan, M.V., 2005. Methyl parathion modifies foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology* 14, 431–437.

H

- Haarmann, T., Spivam, M., Weaver, D., Weaver, B., Glenn, T., 2002. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: *Apidae*) in two commercial queen rearing operations. *Journal of Economic Entomology* 95, 28–35.
- Hajšlová, J., Zrostlíková, J., 2003. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A* 1000, 181–197.
- Hannon, L.E., Sisk, T.D., 2009. Hedgerows in an agri-natural landscape: potential habitat value for native bees. *Biological Conservation* 142, 2140–2154.
- Hare, L., Tessier, A., 1998. The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnology and Oceanography* 43, 1850–1859.
- Hassanein, M.H., 1953. The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honeybee. *Annals of Applied Biology* 40, 418–423.
- Hatabian, G., Saporta, G., 1986. Régions de confiance en analyse factorielle. *Data Analysis and Informatics IV*, 499–508.
- Hejda, M., Pyšek, P., Jarošík, V., 2009. Impact of invasive plants on the species richness, diversity and composition of invaded communities. *Journal of Ecology* 97, 393–403.
- Henny, C.J., Kolbe, E.J., Hill, E.F., Blus, L.J., 1987. Case histories of bald eagles and other raptors killed by organophosphorus insecticides topically applied to livestock. *Journal of Wildlife Diseases* 23, 292–295.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Scienceexpress* 10.1126, science.1215039, 4p.
- Hernández, F., Portolés, T., Pitarch, E., López, J., 2011. Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 388–400.

- Hernando, M.D., Suárez-Barcena, J.M., Bueno, M.J.M., Garcia-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R., 2007. Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. *Journal of Chromatography A* 1155, 62–73.
- Hewavitharana, A.K., 2011. Matrix matching in liquid chromatography-mass spectrometry with stable isotope labeled internal standards – is it necessary? *Journal of Chromatography A* 1218, 359–361.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010a. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bernal, J., 2010b. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2, 243–250.
- Hobbs, N.T., Galvin, K.A., Stokes, C.J., Lockett, J.M., Ash, A.J., Boone, R.B., Reid, R.S., Thornton, P.K., 2008. Fragmentation of rangelands: implications for humans, animals, and landscapes. *Global Environmental Change* 18, 776–785.
- Hodgeson, J.W., 1990. Method 550.1 Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with couple ultraviolet and fluorescence detection. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office Of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268, 1–22.
- Holmstrup, M., Bindsbøl, A-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Science of the Total Environment* 408, 3746–3762.
- Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Kleijn, D., Tschardtke, T., 2007. Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: effects of farming system, landscape composition and regional context. *Journal of Applied Ecology* 44, 41–49.
- Holzschuh, A., Dudenhöffer, J-H., Tschardtke, T., 2012. Landscapes with wild bee habitats enhance pollination, fruit set and yield of sweet cherry. *Biological Conservation* 153, 101–107.

Hügel, M.F., 1962. Etudes de quelques constituants du pollen in : Annales de l'abeille V, 97–133.

Huryn, V.M.B., 1997. Ecological impacts of introduced honey bees. The Quarterly Review of Biology 72, 275–297.

I

INERIS, 2003. Plomb et ses dérivés. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N°2-1/2003, 1–90.

INERIS, 2005. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, guide méthodologique : acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude N°66244-DESP-R01, 99p.

International Conference on Harmonisation (ICH), Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

Iwaniuk, A.N., Koperski, D.T., Cheng, K.M., Elliott, J.E., Smith, L.K., Wilson, L.K., Wylie, D.R.W., 2006. The effects of environmental exposure to DDT on the brain of a songbird: changes in structures associated with mating and song. Behavioural Brain Research 173, 1–10.

J

Jaffé, R., Dietemann, V., Allsopp, M.H., Costa, C., Crewe, R.M., Dall'Olio, R., de la Rua, P., El-Niweiri, M.A.A., Fries, I., Kezic, N., Meusel, M.S., Paxton, R.J., Shaibi, T., Stolle, E., Moritz, R.F.A., 2010. Estimating the density of honey bee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. Conservation Biology 24, 583–593.

Janssens, X., Bruneau, E., Lebrun, P., 2006. Préviation des potentialités de production de miel à l'échelle d'un rucher au moyen d'un système d'information géographique. Apidologie 37, 351–365.

Johansen, C.A., Mayer, D.F., Eves, J.D., Kious, C.W., 1983. Pesticides and bees. Environmental Entomology 12, 1513–1518.

Johnson, R.M., Pollock, H.S., Berenbaum, M.R., 2009. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. Journal of Economic Entomology 102, 474–479.

Johnson, R.M., 2011. Managed pollinator coordinated agricultural project – miticide and fungicide interactions. *American Bee Journal* 151, 975–978.

Jones, K.C., 1987. Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water, Air, and Soil Pollution* 33, 179–189.

K

Kalbande, D.M., Dhadse, S.N., Chaudhari, P.R., Wate, S.R., 2008. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment* 138, 233–238.

Kamel, A., 2010. Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 58, 5926–5931.

Kenis, M., Auger-Rozenberg, M-A.A., Roques, A., Timms, L., Péré, C., Cock, M.J.W., Settele, J., Augustin, S., Lopez-Vaamonde, C., 2009. Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions* 11, 21–45.

Kevan, P.G., 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 373–393.

Kerkvliet, J.D., 1983. Lead and cadmium contents of honey. *Maandschrift voor Bijenteelt* 85, 251–253.

Kinsella, B., Lehotay, S.J., Mastovska, K., Lighlfield, A.R., Furey, A., Danaher, M., 2009. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 637, 196–207.

Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society* 274, 303–313.

Koch, H., Weisser, P., 2001. Spray deposits of crop protection products on plants – the potential exposure of non-target arthropods. *Chemosphere* 44, 307–312.

Koesukwiwat, U., Lehotay, S.J., Miao, S., Leepipatiboon, N., 2010. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 6692–6703.

- Kosior, A., Celary, W., Olejniczak, P., Fijal, J., Król, W., Solarz, W., Plonka, P., 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: *Apidae: Bombini*) of Western and Central Europe. *Oryx* 41, 79–88.
- Kotthoff, U., Wappler, T., Engel, M.S., 2011. Miocene honey bees from the Randeck Maar of Southwestern Germany (Hymenoptera, *Apidae*). *ZooKeys* 96, 11–37.
- Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B. and Siriwardena, G.M., 1999. The second silent spring. *Nature*. 400, 611–612.
- Kremen, C., Williams, N.M., Thorp, R.W., 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16812–16816.
- Kremen, C., Williams, N.M., Aizen, M.A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., Packer, L., Potts, S.G., Roulston, T., Steffan-Dewenter, I., Vázquez, D.P., Winfree, R., Adams, L., Crone, E.E., Greenleaf, S.S., Keitt, T.H., Klein, A-M., Regetz, J., Ricketts, T.H., 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters* 10, 299–314.
- Krogh, K.A., Björklund, E., Loeffler, D., Fink, G., Halling-Sørensen, B., Ternes, T.A., 2008. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1211, 60–69.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7, e29268.
- Kürschner, W.M., Kvaček, Z., Dilcher, D.L., 2008. The impact of Miocene atmospheric carbon dioxide fluctuations on climate and the evolution of terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 449–453.

L

- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, Editions Tec & Doc, Paris, France, 320p.
- Lambert, O., Pouliquen, H., Clergeau, P., 2005. Impact des insecticides inhibiteurs des cholinestérasés sur la faune sauvage non cible : essai de synthèse des travaux relatifs aux vertébrés terrestres. *Revue d'Ecologie (Terre Vie)* 60, 3–20.

- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012a. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution* 170, 254–259.
- Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012b. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 86, 98–104.
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L’Hostis, M., Wiest, L., Buleté, A., Delbac, F., Pouliquen, H. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. *PLoS ONE*. Soumis.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18.
- Leandro, C.C., Fussell, R.J., Keely, B.J., 2005. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1085, 207–212.
- Leandro, C.C., Hancock, P., Fussell, R.J., Keely, B.J., 2007. Quantification and screening of pesticide residues in food by gas chromatography-exact mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1166, 152–162.
- Leblebici, Z., Aksoy, A., 2008. Determination of heavy metals in honey samples from Central Anatolia using plasma optical emission spectrophotometry (ICP-OES). *Polish Journal of Environmental Studies* 17, 549–555.
- Le Conte, Y., 2002. L’abeille dans la classification des insectes. *Abeilles & Fleurs* 628, 15–16.
- Le Conte, Y., Navajas, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique – Office International des Epizooties* 27, 499–510.
- LeDoux, M., 2011. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A* 1218, 1021–1036.
- Le Féon, V., Schermann-Legionnet, A., Delettre, Y., Aviron, S., Billeter, R., Bugter, R., Hendrickx, F., Burel, F., 2010. Intensification of agriculture, landscape composition and wild bee communities: a large scale study in four European countries. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 137, 143–150.

- Lehotay, S.J., Mastovska, K., Lightfield, A.R., 2005. Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International* 88, 615–629.
- Leita, L., Muhlbachova, G., Cesco, S., Barbattini, R., Mondini, C., 1996. Investigation of the use of honeybees and honey bee products to assess heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* 43, 1–9.
- Lesueur, C., Knittl, P., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M., 2008. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control* 19, 906–914.
- Lewis, L.A., Poppenga, R.J., Davidson, W.R., Fischer, J.R., Morgan, K.A., 2001. Lead toxicosis and trace element levels in wild birds and mammals at a firearms training facility. *Environmental Contamination and Toxicology* 41, 208–214.
- L’Hostis, M., Pouliquen, H., 2010. Rapport annuel « L’Abeille mellifère (*Apis mellifera*) témoin de la pollution de l’environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. 154p.
- Lodesani, M., Costa, C., Bigliardi, M., Colombo, R., 2003. Acaricide residues in bee wax and organic beekeeping. *Apiacta* 38, 31–33.
- Loibl, W., Toetzer, T., 2002. Modeling growth and densification processes in suburban regions – simulation of landscape transition with spatial agents. *Environmental Modelling & Software* 18, 553–563.
- Losey, J.E., Vaughan, M., 2006. The economic value of ecological services provided by insects. *Bioscience* 56, 311–323.
- Louveaux, J., 1958. Plantes utilisées par les abeilles in : *Annales de l’Abeille, Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (Apis mellifica L.)* IV, 197–215.
- Louveaux, J., 1959. Recherches sur l’origine des variations qualitatives in : *Annales de l’Abeille, Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (Apis mellifica L.)* I, 13–111.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G., 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World* 59, 139–157.

- MacDonald, D.W., Johnson, P.J., 2000. Farmers and the custody of the countryside: trends in loss and conservation of non-productive habitats 1981-1998. *Biological Conservation* 94, 221–234.
- MacKenzie, K.E., Winston, M.L., 1989. The effects of sublethal exposure to diazinon, carbaryl and resmethrin on longevity and foraging in *Apis mellifera* L. *Apidology* 20, 29–40.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P., Eguaras, M.J., 2010. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology Research* 107, 1189–1192.
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., Klimkiewicz-Pawlas, A., 2009. Concentrations, sources, and spatial distribution of individual polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils in the Eastern part of the EU: Poland as a case study. *Science of the Total Environment* 407, 3746–3753.
- Malone, L.A., Pham-Delègue, M-H., 2001. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus sp.*). *Apidologie* 32, 287–304.
- Martel, A-C., Zeggane, S., Aurière, C., Drajnudel, P., Faucon, J-P., Aubert, M., 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® and Asuntol®50. *Apidologie* 38, 534–544.
- Martena, M.J., Grutters M.M.P., De Groot, H.N., Konings E.J.M., Rietjens, I.M.C.M., 2011. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in food supplements containing botanicals and other ingredients on the Dutch market. *Food Additives & Contaminants* 28, 925–942.
- Mattila, H.R., Seeley, T.D., 2007. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Sciences* 317, 362–364.
- Maver, L., Poklukar, J., 2003. Coumaphos and amitraz residues in Slovenian honey. *Apiacta* 38, 54–57.
- McKinney, M.L., 2008. Effects of urbanization on species richness: a review of plants and animals. *Urban Ecosystems* 11, 161–176.
- McLaughlin, A., Mineau, P., 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 55, 201–212.

- Medina, P., Budia, F., Del Estal, P., Adan, A., Viñuela, E., 2004. Toxicity of fipronil to the predator lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: *Chrysopidae*). *Biocontrol Science and Technology* 14, 261–268.
- Meled, M., Thrasyvoulou, A., Belzunces, L.P., 1998. Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2517–2520.
- Michel, N., Burel, F., Legendre, P., Butet, A., 2007. Role of habitat and landscape in structuring small mammal assemblages in hedgerow networks of contrasted farming landscapes in Brittany, France. *Landscape Ecology* 22, 1241–1253.
- Miller-Ihli, N.J., 1994. Graphite furnace atomic absorption method for the determination of lead in sugars and syrups. *Journal of AOAC International* 77, 1288–1292.
- Miller-Ihli, N.J., Greene, F.E., 1993. Direct determination of lead in sugars using graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Atomic Spectroscopy* 4, 85–89.
- Monteiro, A.T., Fava, F., Hiltbrunner, E., Della Marianna, G., Bocchi, S., 2011. Assessment of land cover changes and spatial drivers behind loss of permanent meadows in the lowlands of Italian Alps. *Landscape and Urban Planning* 100, 287–294.
- Moret, S., Purcaro, G., Conte, L.S., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in propolis and propolis-based dietary supplements from the Italian market. *Food Chemistry* 122, 333–338.
- Morgano, M.A., Teixeira Martins, M.C., Rabonato, L.C., Milani, R.F., Yotsuyanagi, K., Rodriguez-Amaya, B., 2010. Inorganic contaminants in bee pollen from Southeastern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6876–6883.
- Moritz, R.F.A., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R.J., 2010. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41, 227–242.
- Morse, R.A., Lisk, D.J., 1980. Element analysis of honeys from several nations. *American Bee Journal* 120, 522–523.
- Morse, R.A., Culliney, T.W., Gutenmann, W.H., Littman, C.B., Lisk, D.J., 1987. Polychlorinated biphenyls in honey bees. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 38, 271–276.
- Motelay-Massei, A., Ollivon, D., Garban, B., Tiphagne-Larcher, K., Zimmerlin, I., Chevreuil, M., 2007. PAHs in the bulk atmospheric deposition of the Seine river basin: source identification and apportionment by ratios multivariate statistical techniques and scanning electron microscopy. *Chemosphere* 67, 312–321.

- Mouret, C., Lambert, O., Piroux, M., Beaudeau, F., Provost, B., Bénét, P., Colin, M-E., L'Hostis, M. A field study of the prevalence of 12 infectious agents in 18 apiaries in western France. *Applied and Environmental Microbiology*. Soumis.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5, e9754.
- Muralidharan, S., 1993. Aldrin poisoning of Sarus cranes (*Grus antigone*) and a few granivorous birds in Keoladeo Park, Bharatpur, India. *Ecotoxicology* 2, 196–202.
- Murray, A., 1985. Acute and residual toxicity of a new pyrethroid insecticide, WL85871, to honey-bees. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 560–564.

N

- Needleman, H.L., Bellinger, D., 1991. The health effects of low level exposure to lead. *Annual Review of Public Health* 12, 111–140.
- Nehring, R.B., 1976. Aquatic insects as biological monitors of heavy metal pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 15, 147–154.
- Neumann, P., Carreck, N.L., 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49, 1–6.
- Newton, I., Wyllie, I., Asher, A., 1992. Mortality from the pesticides aldrin and dieldrin in British sparrowhawks and kestrels. *Ecotoxicology* 1, 31–44.
- NF V03-061; N F EN 15662:2009-01-01 Foods of plant origin—determination of pesticide residues using GC–MS and/or LC–MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE—QuEChERS-method.
- Nriagu, J.O., Blankson, M.L., Ocran, K., 1996. Childhood lead poisoning in Africa: a growing public health problem. *Science of the Total Environment* 181, 93–100.

O

- Observatoire des Résidus de Pesticides ; site consulté le 02/08/2012. <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=380>.
- Öckinger, E., Smith, H.G., 2007. Semi-natural grasslands as population sources for pollinating insects in agricultural landscapes. *Journal of Applied Ecology* 44, 50–59.

- Ohlendorf, H.M., Swineford, D.M., Locke, L.N., 1981. Organochlorine residues and mortality of herons. *Pesticides Monitoring* 14, 125–135.
- Ondo Zue Abaga, N., Alibert, P., Dousset, S., Savadogo, P.W., Savadogo, M., Sedogo, M., 2011. Insecticide residues in cotton soils of Burkina Faso and effects of insecticides on fluctuating asymmetry in honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Chemosphere* 83, 585–592.
- Orantes-Bermejo, F.J., Pajuelo, A.G., Megias, M.M., Fernández-Piñar, C.T., 2010. Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research* 48, 243–250.
- Otti, O., Schmid-Hempel, P., 2007. *Nosema bombi*: a pollinator parasite with detrimental fitness effects. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 118–124.
- Otto, K., Jekat, F., 1977. Experimental investigations on the contamination of a food with residues of lead, zinc, cadmium. *Ernahrungs Umschau* 24, 107–109.
- Overmann, S.R., Krajicek, J.J., 1995. Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as biomonitors of lead contamination of the Big River in Missouri's old lead belt. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 689–695.
- Overmyer, J.P., Mason, B.N., Armbrust, K.L., 2005. Acute toxicity of imidacloprid and fipronil to a nontarget aquatic insect *Simulium vittatum* Zetterstedt cytospecies IS-7. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74, 872–879.

P

- Pain, D.J., Carter, I., Sainsbury, A.W., Shore, R.F., Eden, P., Taggart, M.A., Konstantinos, S., Walker, L.A., Meharg, A.A., Raab, A., 2007. Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Science of the Total Environment* 376, 116–127.
- Paini, D.R., 2004. Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: *Apidae*) on native bees: a review. *Austral Ecology* 29, 399–407.
- Palmer, M.R., Smith, D.R., Kaftanoğlu, O., 2000. Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *The Journal of Heredity* 91, 42–46.

- Parent, J., Feller-Demalsy, M.J., Richard, P.J.H., 1990. Les sources de pollen et de nectar dans la région de Rimouski, Québec, Canada. *Apidologie* 21, 431–445.
- Parrish, Z.D., White, J.C., Isleyen, M., Gent, M.P.N., Iannucci-Berger, W., Eitzer, B.D., Kelsey, J.W., Incorvia Mattina, M., 2006. Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere* 64, 609–618.
- Pathirana, S., Connell, D.W., Vowles, P.D., 1994. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban roadway system. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28, 256–269.
- Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A., 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 1697–1714.
- Perrard, A., Haxaire, J., Rortais, A., Villemant, C., 2009. Observations on the colony activity of the asian hornet *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) in France. *Annales de la Société Entomologique de France* 45, 119–127.
- Perugini, M., Di Serafino, G., Giacomelli, A., Medrzyck, P., Sabatini, A.G., Persano Oddo, L., Marinelli, E., Amorena, M., 2009. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 57, 7440–7444.
- Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M.C., Tarasco, R., Amorena, M., 2011. Heavy metals (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research* 140, 170–176.
- Perugini, M., Grotta, L., Turno, G.A., Manera, M., Amorena, M., 2012. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) : des polluants détectables dans l'environnement grâce à l'abeille. In Jean-Marie Barbançon, Olivier Lambert et Monique L'Hostis, Ed., *Journée Scientifique Apicole*, Nantes, 07 juin 2012, 116p.
- Petelinsek, A., 1977. Lead contamination of honey. *Hrana I Ishrana* 18, 353–355.
- Pettis, J.S., 2004. A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie* 35, 91–92.
- Pettis, J.S., Collins, A.M., Wilbanks, R., Feldlaufer, M.F., 2004. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 35, 605–610.

- Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158.
- Pilling, E.D., Bromeleychallenor, K.A.C., Wlaker, C.H., Jepson, P.C., 1995. Mechanisms of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51, 1–11.
- Pilling, E.D., Jepson, P.C., 1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pesticide Science* 39, 293–297.
- Pingault, N., 2007. Améliorer la qualité de l'eau : un indicateur pour favoriser une utilisation durable des produits phytosanitaires. Atelier OCDE 19-21 mars 2007 Washington. Indicateurs de développement, de suivi et d'analyse des politiques agroenvironnementales. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 10p.
- Piroux, M., Lambert, O., Puyo, S., Farrera, I., Guinet, C., L'Hostis, M., Viguès, B., Bastian, S. Characterization of foraging area of the honeybees, *Apis mellifera*, in western France by land-cover data and pollen spectra. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Soumis.
- Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F., 2008. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry* 72, 89–95.
- Planetoscope.com ; site consulté le 02/08/2012 ; <http://www.planetoscope.com/sols/47-consommation-de-pesticides-phytosanitaires-en-france.html>.
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C., Higes, M., 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: *Apidae*) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 1, 131–135.
- Ponikvar, M., Šnajder, J., Sedej, B., 2005. Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂¹. *Apidologie* 36, 403–409.
- Porrini, C., Ghini, S., Girotti, S., Sabatini, A.G., Gattavecchia, E., Celli, G., 2002. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In J. Devillers & M.H. Pham-Delègue (Eds), *Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals* (pp. 187–247). New York: Taylor & Francis, USA, 332p.

- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E., Celli, G., 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta* 38, 63–70.
- Portolés, T., Pitarch, E., López, F.J., Hernández, F., 2011. Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 303–315.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010a. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 345–353.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010b. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research* 49, 15–22.
- Pratt, C.R., Sikorski, R.S., 1982. Lead content of wildflowers and honey bees (*Apis mellifera*) along a roadway: possible contamination of a simple food chain. *Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science* 56, 151–152.
- Przybyłowski, P., Wilczyńska, A., 2001. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry* 74, 289–291.
- Przybylski, C., Segard, C., 2009. Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 32, 1858–1867.

Q - R

- R Development Core Team, 2010. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Raes, H., Cornelis, R., Rzeznik, U., 1992. Distribution, accumulation and depuration of administered lead in adult honeybees. *Science of the Total Environment* 113, 269–279.
- Rainbow, P.S., Wolowicz, M., Fialkowski, W., Smith, B.D., Sokolowski, A., 2000. Biomonitoring of trace metals in the Gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvises*). *Water Research* 34, 1823–1829.

- Ramirez-Romero, R., Chauffaux, J., Pham-Delègue, M-H., 2005. Effects of Cry1Ab, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36, 601–611.
- Rashed, M.N., Soltan, M.E., 2004. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *Journal of Food Composition and Analysis* 17, 725–735.
- Reemtsma, T., Quintana, J.B., Rodil, R., Garcia-López, M., Rodriguez, I., 2008. Organophosphorus flame retardants and plasticisers in water and air. Part I: occurrence and fate. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 727–737.
- Reidsma, P., Tekelenburg, T., van den Berg, M., Alkemade, R., 2006. Impacts of land-use change on biodiversity: an assessment of agricultural biodiversity in the European Union. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 114, 86–102.
- Rivière, M., Olivier, V., Blanchard, P., 2010. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S120–S131.
- Rieth, J.P., Levin, M.D., 1989. Repellency of two phenyl-acetate-ester pyrethroids to the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 28, 175–179.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., de Almeida, M.V., Gerenutti, M., Apon, B.M., 2007. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry* 101, 1719–1726.
- Robinson, R.A., Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *Journal of Applied Ecology* 39, 157–176.
- Roman, A., 2005. The influence of environment on accumulation of toxic elements in honey bees' body. *ISAH* 2, 423–426.
- Roman, A., 2007. Content of some trace elements in fresh honey-bee pollen. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57, 475–478.
- Roman, A., 2009. Concentration of chosen trace elements of toxic properties in bee pollen loads. *Polish Journal of Environmental Studies* 18, 265–272.
- Roman, A., 2010. Levels of copper, selenium, lead and cadmium in forager bees. *Polish Journal of Environmental Studies* 19, 663–669.
- Roman, A., Madras-Majewska, B., Popiela-Pleban, E., 2011. Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *Journal of Apicultural Science* 55, 97–106.

- Rose, R., Dively, G.P., Pettis, J., 2007. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 38, 368–377.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S96–S119.
- Rowarth, J.S., 1990. Lead concentrations in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research* 29, 177–180.
- Roy, C., 2010. La lutte contre les maladies vectorielles en médecine vétérinaire et les risques pour la santé des abeilles. In Jean-Marie Barbançon et Monique L’Hostis, Ed., *Journée Scientifique Apicole*, Nantes, 18 mars 2010, 85p.
- Rundlöf, M., Nilsson, H., Smith, H.G., 2008. Interacting effects of farming practice and landscape context on bumble bees. *Biological Conservation* 141, 417–426.

S

- Sabatini, A.G., Carpana, E., Serra, G., Colombo, R., 2003. Presence of acaricides and antibiotics in samples of Italian honey. *Apiacta* 38, 46–49.
- Sabatini, A.G., 2005. L’Abeille bio-indicateur, l’abeille sentinelle de l’environnement. *Abeille & Compagnie*, 108, 12–16.
- Sammataro, D., Untalan, P., Guerrero, F., Finley, J., 2005. The resistance of varroa mites (*Acari: Varroidae*) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology* 31, 67–74.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2001. Wildlife exposure to organophosphorus insecticides. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 172, 21–63.
- Schneider, C.W., Tautz, J., Grünewald, B., Fuchs, S., 2012. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7, e30023.
- Schricker, B., Stephen, W.P., 1970. The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behavior. I. Oral administration and the communication dance. *Journal of Apicultural Research* 9, 141–153.
- Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987, 57–66.

- Sileo, L., Karstad, L., Frank, R., Holdrinet, M.V.H., Addison, E., Braun, H.E., 1977. Organochlorine poisoning of ring-billed gulls in Southern Ontario. *Journal of Wildlife Diseases* 13, 313–322.
- Smalling, K.L., Kuivila, K.M., 2008. Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments. *Journal of Chromatography A* 1210, 8–18.
- Smith, K.E.C., Thomas, G.O., Jones K.C., 2001. Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAHs. *Environmental Science and Technology* 35, 2156–2165.
- Sodré, G.d.S., Marchini, L.C., Zucchi, O.L.A.D., Filho, V.F.N., Otsuk, I.P., de Camargo Carmello Moreti, A.C., 2007. Determination of chemical elements in Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) honey samples from the state of Piauí, Brazil. *Quimica Nova* 30, 920–924.
- Sotherton, N.W., 1998. Land use changes and the decline of farmland wildlife: an appraisal of the set-aside approach. *Biological Conservation* 83, 259–268.
- Starr, C.K., 1998. Systematics and comparative biology of the honeybees. *Proceedings of the First Caribbean Beekeeping Congress, Tobago 1998*, 72–92.
- Steffan-Dewenter, I., Tschardtke, T., 2000. Resource overlap and possible competition between honey bees and wild bees in central Europe. *Oecologia* 122, 288–296.
- Steffan-Dewenter, I., Münzenberg, U., Bürger, C., Thies, C., Tschardtke, T., 2002. Scale-dependent effects of landscape structure on the three pollinator guilds. *Ecology* 83, 1421–1432.
- Steffan-Dewenter, I., Kuhn, A., 2003. Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 569–575.
- Stein, K., Umland, F., 1986. Estimation of traces of lead, cadmium and manganese in honeys and sugars. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 323, 176–177.
- Stoate, C., Boatman, N.D., Borralho, R.J., Rio Carvalho, C., de Snoo, G.R., Eden, P., 2001. Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* 63, 337–365.
- Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N.D., Herzon, I., van Doorn, A., de Snoo, G.R., Rakosy, L., Ramwell, C., 2009. Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe – A review. *Journal of Environmental Management* 91, 22–46.
- Strong, L., 1992. Avermectins: a review of their impact on insects of cattle dung. *Bulletin of Entomological Research* 82, 265–274.

Suárez, V.H., Lifschitz, A.L., Sallovitz, J.M., Lanusse, C.E., 2009. Effects of faecal residues of moxidectin and doramectin on the activity of arthropods in cattle dung. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1551–1558.

Sugden, E.A., Pyke, G.H., 1991. Effects of honey bees on colonies of *Exoneura asimillima*, an Australian native bee. *Australian Journal of Ecology* 16, 171–181.

T

Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukawa, R., 1994. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Science of the Total Environment* 154, 163–177.

Tao, S., Cui, Y.H., Xu, F.L., Li, B.G., Cao, J., Liu, W.X., Schmitt, G., Wang, X.J., Shen, W.R., Qing, B.P., Sun, R., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *Science of the Total Environment* 320, 11–24.

Tarpy, D.R., 2003. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270, 99–103.

Tataruch, F., 1995. Red deer antlers as biomonitors for lead contamination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 332–337.

Telišman, S., Čolak, B., Pizent, A., Jurasović, J., Cvitković, P., 2007. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environmental Research* 105, 256–266.

Thompson, H., Wilkins, S., 2003. Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology* 56, 131–134.

Thomson, D., 2004. Competitive interactions between the invasive European honey bee and native bumble bees. *Ecology* 85, 458–470.

Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S., Olivier, J.M., 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7, 75–83.

Totti, S., Fernández, M., Ghini, S., Picó, Y., Fini, F., Mañes, J., Girotti, S., 2006. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Talanta* 69, 724–729.

- Tscharntke, T., Klein, A.M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., Thies, C., 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity – ecosystem service management. *Ecology Letters* 8, 857–874.
- Tsigouri, A., Menkissoglu-Spiroudi, U., Thrasyvoulou, A., Diamantidis, G., 2003. Fluralinate residues in Greek honey and beeswax. *Apiacta* 38, 50–53.
- Tudoreanu, L., Crivineanu, V., Goran, G.V., Codreanu, M.D., 2008. Models (nominal logistic regression and anova) for lead accumulation in honey. *Bulletin USAMV Veterinary Medicine* 65, 1p.
- Tuell, J.K., Fiedler, A.K., Landis, D., Isaacs, R., 2008. Visitation by wild and managed bees (Hymenoptera: Apoidea) to Eastern U.S. native plants for use in conservation programs. *Environmental Entomology* 37, 707–718.
- Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M., 2007. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chemistry* 103, 325–330.

U, V

- Van Buren, N.W.M., Mariën, J., Velthuis, H.H.W., Oudejans, R.C.H.M., 1992. Residues in beeswax and honey of perizin, an acaricide to combat the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Mesostigmata). *Environmental Entomology* 21, 860–865.
- Vandame, R., Meled, M., Colin, M-E., Belzunces, L.P., 1995. Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 855–860.
- Vandame, R., Belzunces, L.P., 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neuroscience Letters* 251, 57–60.
- van der Schalie, W.H., Gardner Jr., H.S., Bantle, J.A., De Rosa, C.T., Finch, R.A., Reif, J.S., Reuter, R.H., Backer, L.C., Burger, J., Folmar, L.C., Stockes, W.S., 1999. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives* 107, 309–315.
- van der Steen, J.J.M., de Kraker, J., Grotenhuis, T., 2011. Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 4119–4126.

- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE* 4, e6481.
- vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S80–S95.
- Veleminsky, M., Laznicka, P., Stary, P., 1990. Honeybees (*Apis mellifera*) as environmental monitors of heavy metals in Czechoslovakia. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 87, 37–44.
- Veyrand, B., Brosseaud, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *Journal of Chromatography A* 1149, 333–344.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., Alaoui, E., Belzunces, L.P., Delbac, F., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 6, e21550.
- Vinas, P., Lopez-Garcia, I., Lanzon, M., Hernandez-Cordoba, M., 1997. Direct determination of lead, cadmium, zinc and copper in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry using hydrogen peroxide as a matrix modifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3952–3956.
- Vinas, P., Pardo-Martinez, M., Hernandez-Cordoba, M., 2000. Rapid determination of selenium, lead, and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. *Analytica Chimica Acta* 412, 121–130.
- Visscher, P.K., Seeley, T.D., 1982. Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest. *Ecology* 63, 1790–1801.
- Visscher, P.K., Crailsheim, K., Sherman, G., 1996. How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights? *Journal of Insect Physiology* 42, 1089–1094.
- Voget, M., 1989. Bees and beeproducts as biological indicators of environmental contamination: an economical alternative way of monitoring pollutants. *Toxicology and Environmental Chemistry* 20, 199–202.

Von der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P., 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* 35, S18–S25.

W

Walker, C.H., Hamilton, G.A., Harrison, R.B., 1967. Organochlorine insecticide residues in wild birds in Britain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18, 123–129.

Waller, G.D., Barker, R.J., 1979. Effects of dimethoate on honey bee colonies. *Journal of Economic Entomology* 72, 549–551.

Wallner, K., 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30, 235–248.

Walorczyk, S., Gnusowski, B., 2009. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 6522–6531.

Wang, X.-C., Zhang, Y.-X., Chen, R.F., 2001. Distribution and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in sediments from Boston Harbor, United States. *Marine Pollution Bulletin* 42, 1139–1149.

Wardhaugh, K.G., Longstaff, B.C., Morton, R., 2001. A comparison of the development and survival of the dung beetle, *Onthophagus Taurus* (Schreb.) when fed on the faeces of cattle treated with pour-on formulations of eprinomectin or moxidectin. *Veterinary Parasitology* 99, 155–168.

Ware, G.W., 1980. Effects of pesticides on nontarget organisms. *Residue Reviews* 76, 173–201.

Weibull, A.-N., Östman, Ö., Granqvist, Å., 2003. Species richness in agroecosystems: the effect of landscape, habitat and farm management. *Biodiversity and Conservation* 12, 1335–1355.

Weick, J., Thorn, R.S., 2002. Effects of acute sublethal exposure to coumaphos or diazinon on acquisition and discrimination of odor stimuli in the honey bee (Hymenoptera: *Apidae*). *Journal of Economic Entomology* 95, 227–236.

Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Scienceexpress*, 10.1126, science.1215025, 3p.

- Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., Pouliquen, H., Arnaudguilhem, C., 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1218, 5743–5756.
- Wilkowska, A., Biziuk, M., 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* 125, 803–812.
- Williams, P.H., Osborne, J.L., 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie* 40, 367–387.
- Williamson, P., Evans, P.R., 1972. Lead: levels in roadside invertebrates and small mammals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 8, 280–288.
- Wratten, S.D., Forbes, A.B., 1996. Environmental assessment of veterinary avermectins in temperate pastoral ecosystems. *Annals of Applied Biology* 128, 329–348.
- Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE* 6, e14720.
- Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2012. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 326–329.

X - Y - Z

- Yang, H.H., Lee, W.J., Chen, S.J., Lai, S.O., 1998. PAH emission from various industrial stacks. *Journal of Hazardous Materials* 60, 159–174.
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H., 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: *Apidae*). *Journal of Economic Entomology* 101, 1743–1748.
- Yarsan, E., Karacal, F., Ibrahim, I.G., Dikmen, B., Koksall, A., Das, Y.K., 2007. Contents of some metals in honeys from different regions in Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 255–258.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 368, 456–464.

ANNEXES



Annexe 1. Liste des publications scientifiques, des communications et des co-encadrements de stages réalisés dans le cadre de ce travail de thèse

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Lambert O., Piroux M. Puyo S., Thorin C., Larhantec M., Delbac F., Pouliquen H, 2012. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution* 170, 254–259.

Lambert O., Piroux M., Puyo S., Thorin C., L’Hostis M., Wiest L., Buleté A., Delbac F., Pouliquen H. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. *PLoS ONE*. Soumis.

Lambert O., Pouliquen H., Clergeau P., 2005. Impact des insecticides inhibiteurs des cholinestérases sur la faune sauvage non cible : essai de synthèse des travaux relatifs aux vertébrés terrestres. *Revue d’Ecologie (Terre Vie)* 60, 3–20.

Lambert O., Pouliquen H., Larhantec M., Thorin C., L’Hostis M., 2007. Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumafén, brodifacoum): epidemiological survey in Loire Atlantique (France). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 91–94.

Lambert O., Veyrand B., Durand S., Marchand P., Le Bizec B., Piroux M., Puyo S., Thorin C., Delbac F., Pouliquen H., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 86, 98–104.

Mouret C., **Lambert O.**, Piroux M., Beaudeau F., Provost B., Bénet P., Colin M-E, L’Hostis M. A field study of the prevalence of 12 infectious agents in 18 apiaries in western France. *Applied and Environmental Microbiology*. Soumis.

Piroux M., **Lambert O.**, Puyo S., Farrera I., Guinet C., L'Hostis M., Viguès B., Bastian S. Characterization of foraging area of the honeybees, *Apis mellifera*, in western France by landcover data and pollen spectra. Agriculture, Ecosystems and Environment. Soumis.

Wiest L., Buleté A., Giroud B., Fratta C., Amic S., **Lambert O.**, Pouliquen H., Arnaudguilhem C., 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A, 1218, 5743–575.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ORALES

L'Hostis M., **Lambert O.** Santé des pollinisateurs. Atelier « Biodiversité et santé animale » 61st Congrès WDA, 23 juillet 2012, Lyon (France, 69).

Lambert O., Puyo S., Thorin C., Wiest L., Buleté A., Delbac F., Pouliquen H. Honeybees, honey and pollen as sentinels to monitor pesticides presence in environment. 12th EAVPT Congress, 08-12 July 2012, Noordwijkerhout (Netherlands).

Lambert O. Contamination de matrices apicoles au sein de ruchers appartenant à des structures paysagères différentes. Les Journées de l'Ecole Doctorale 2012, Université de Clermont-Ferrand, 24 et 25 mai 2012, Aubière (France, 63).

L'Hostis M., **Lambert O.** Etude écotoxicologique dans le cadre de l'étude Abeille sentinelle de la santé des écosystèmes en Pays de la Loire. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires, 23-25 mai 2012, Nantes (France, 44).

Puyo S., **Lambert O.**, L'Hostis M. Les matrices apicoles comme sentinelles de l'exposition environnementale aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Journée Scientifique « Santé et préservation des écosystèmes en Pays de la Loire », 22 juin 2011, Nantes (France, 44).

Lambert O., Piroux M., Caseteuble R., L'Hostis M., Bastian S., Delbac F., Pouliquen H. Analyses toxicologiques dans le cadre de l'étude Abeille sentinelle de la pollution de l'environnement : premières exploitations des résultats. Journée Scientifique Apicole, 11 février 2011, Arles (France, 13).

Piroux M., **Lambert O.**, Caseteuble R., Guilberteaud I., Blanchard I., L'Hostis M., Pouliquen H., Viguès B., Bastian S. Enquêtes sur les pratiques phytosanitaires et vétérinaires dans le grand-ouest et utilisation de l'Abeille (*Apis mellifera*) comme sentinelle de ces pratiques. Journée Scientifique Apicole, 11 février 2011, Arles (France, 13).

Mouret C., **Lambert O.**, Beaudeau F., Piroux M., Provost B., Bénét P., Colin M-E., L'Hostis M. Portage d'agents infectieux : données préliminaires dans le cadre d'une étude de cohorte de 18 ruchers dans l'ouest de la France. Journée Scientifique Apicole, 11 février 2011, Arles (France, 13).

Piroux M., **Lambert O.**, Bastian S. Le Système d'Information Géographique SIG, outil informatique pour la gestion de données écotoxicologiques et la caractérisation paysagère d'une aire de butinage. Journée Scientifique Apicole, 18 mars 2010, Nantes (France, 44).

Lambert O., Bastian S., Guilberteaud I., L'Hostis M., Pouliquen H. L'Abeille mellifère sentinelle de la pollution de l'environnement : mise en place et protocole d'étude sur un transect paysager de Pays de la Loire. Journée Scientifique Apicole, 26 février 2009, Saint Avold (France, 57).

Lambert O., Pouliquen H., Guilberteaud I., L'Hostis M. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de Loire. 38^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, 21-23 mai 2008, Brest (France, 29).

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Veyrand B., **Lambert O.**, Pouliquen H., Thorin C., Durand S., Piroux M., Puyo S., Marchand P., Antignac J-P., Le Bizec B. Bees, honey and pollen as sentinels for PAH environmental contaminants. ISPAC 23th Congress, 5-8 septembre 2011, Münster (Allemagne).

Lambert O., Bastian S., Guilberteaud I., L'Hostis M., Pouliquen H. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect en Pays de la Loire. Journée Scientifique Apicole, 18 mars 2010, Nantes (France, 44).

Lambert O., Bastian S., Guilberteaud I., L'Hostis M., Pouliquen H. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect en Pays de la Loire. Journées scientifiques de l'AESA et de l'AEEMA, 4 et 5 juin 2009, Maisons-Alfort (France, 94).

COMMUNICATIONS DE TRANSFERT

L'Hostis M., **Lambert O.**, Pouliquen H., Piroux M., Mouret C., Guilberteaud I., Bastian S., Puyo S. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Bretagne et Pays de la Loire, cas particulier des ruchers des îles du PONANT. Conférence au Festival « Les Insulaires », CPIE de Belle Île en Mer, 15 septembre 2012, Le Palais (France, 56).

Lambert O., Piroux M. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation des résultats. Journées Apidays 2012, 22 juin 2012, Laval (France, 53).

Lambert O. Les espèces sentinelles. Exemple de l'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation au Lycée Nature (élèves de 1^{ère} et BTS), 26 mars 2012, La Roche sur Yon (France, 85).

L'Hostis M., **Lambert O.**, Pouliquen H., Piroux M., Mouret C., Guilberteaud I., Bastian S., Puyo S. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire, cas particuliers des ruchers de la Sarthe. Assemblée Générale de l'ASAD 72, 24 mars 2012, Le Mans (France, 72).

Lambert O. Les espèces sentinelles. Exemple de L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation au Lycée Briacé (élèves de 1^{ère} BAC Pro Gestion des Milieux Naturels et de la Faune), 13 janvier 2012, Ancenis (France, 44).

Lambert O. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation pour le DIE Formation Approfondie en Apiculture-pathologie apicole pour les vétérinaires, 09 décembre 2011, Nantes (France, 44).

L'Hostis M., **Lambert O.**, Pouliquen H., Piroux M., Mouret C., Guilberteaud I., Bastian S., Puyo S. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire, cas particulier de l'Ile d'Yeu. Conférence pour le Collectif « Yeu demain », 10-13 novembre 2011, Ile d'Yeu (France, 85).

L'Hostis M., **Lambert O.**, Pouliquen H., Piroux M., Mouret C., Guilberteaud I., Bastian S., Puyo S. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire, cas particuliers du Maine et Loire. Présentation lors de l'Assemblée Générale de l'ASAD 49, 15 octobre 2011, Beaupreau (France, 49).

Lambert O. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation au collège La Noé Lambert dans le cadre du projet « Education au développement durable », 11 octobre 2011, Nantes (France, 44).

Lambert O., L'Hostis M. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation des résultats devant les Services Régionaux de l'Etat : DDPP (44, 85, 49), DRAF, SRAL, DREAL, SGAR, 6 mai 2011, Nantes (France, 44).

Lambert O., L'Hostis M. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Communication de transfert en réponse à la saisine du Président du Conseil Régional de la Région Bretagne (« expertise des liens entre l'utilisation des pesticides systémiques et la surmortalité des abeilles : quelles causes et raisons principales de cette surmortalité et quelles préconisations en Bretagne pour endiguer la perte de biodiversité »), 14 avril 2011, Rennes (France, 35).

Lambert O., Piroux M., Mouret C. L'Hostis M. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Communication devant les Responsables qualité et développement durable des hôtels Pullman, 30 mars 2011, Nantes (France, 44).

Lambert O., Piroux M., L'Hostis M. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Communication devant le Comité de pilotage local de l'étude : apiculteurs, collectivités territoriales et Pôle Agronomique de l'Ouest, 23 mars 2011, Nantes (France, 44).

L'Hostis M., **Lambert O.**, Pouliquen H., Piroux M., Guilberteaud I., Bastian S. L'animal sentinelle de la santé des écosystèmes, exemple de l'Abeille mellifère (*Apis mellifera*), une étude dans l'ouest de la France 2007-2010. Communication devant la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de la France (S.S.N.O.F.) au Muséum National d'Histoire Naturelle de Nantes, 27 novembre 2010, Nantes (France, 44).

Lambert O., Bastian S., Guilberteaud I., L'Hostis M., Pouliquen H. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation pour le DIE Médecine de catastrophe, 13 octobre 2010, Nantes (France, 44).

L'Hostis M., **Lambert O.**, Pouliquen H., Piroux M., Guilberteaud I., Bastian S. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Conférence pour les apiculteurs membres du CARI (apiculture wallonne et bruxelloise), 10 Janvier 2010, Louvain la Neuve (Belgique).

Lambert O. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Assemblée Générale des Apiculteurs de l'Ouest, 26 novembre 2009, Ancenis (France, 44).

L'Hostis M., **Lambert O.**, Bastian S., Guilberteaud I., Pouliquen H. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. 2^{ème} journée de « Bioanalyse et évaluation de produits en santé agroalimentaire et environnement », 19 novembre 2009, Nantes (France, 44).

Lambert O., Bastian S., Guilberteaud I., L'Hostis M., Pouliquen H., Honey bee (*Apis mellifera*) sentinel of the environmental pollution: study in western France. Apimondia, 15-20 septembre 2009, Montpellier (France, 34).

Lambert O. L'Abeille mellifère (*Apis mellifera*) sentinelle de la pollution de l'environnement : étude sur un transect paysager en Pays de la Loire. Présentation devant les administrateurs de Nantes Métropole, 04 décembre 2007, Nantes (France, 44).

Lambert O., L'Hostis M. Abeille sentinelle de l'environnement. Communication devant le GIE « structure apicole », 20 février 2006, Angers (France, 49).

CO-ENCADREMENT DE STAGES

Sophie Puyo

Co-encadrement : **Lambert O.**, Thorin C. L'Abeille sentinelle de l'environnement : analyses multivariées de données écotoxicologiques. Stage de Master II Statistiques appliquées, Agrocampus Ouest, Université de Rennes, soutenu le 6 septembre 2011 à Rennes.

Frédéric Ebner

Co-encadrement : **Lambert O.**, Bastian S. Utilisation des profils polliniques pour la détermination des préférences de butinage des abeilles domestiques dans le paysage. Stage de Master I Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement, Parcours Biologie de l'Environnement, Université de Nantes, soutenu le 28 juin 2011 à Nantes.

Elsa Blanchard

Co-encadrement : L'Hostis M., **Lambert O.** Les pratiques de jardinage en ville, enquêtes réalisées dans le cadre de l'étude « abeille témoin de la santé de l'écosystème ». Stage de Master I Professions du Diagnostic et de l'Expertise Sociologique, Université de Nantes, soutenu le 14 octobre 2010 à Nantes.

Romain Caseteuble

Co-encadrement : Bastian S., **Lambert O.** Caractérisation de la structure paysagère de l'aire de butinage de l'Abeille domestique, *Apis mellifera*, et évaluation de la santé de l'environnement. Stage de Master II Cartographie et Bioproduction des Ecosystèmes, Université de Nantes, soutenu le 14 septembre 2010 à Nantes.

Nicolas Craveia

Co-encadrement : L'Hostis M., **Lambert O.** La cartographie au service des études de l'Abeille domestique. Stage de Master I Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement, Parcours Sciences de la Vie et de la Terre, Université de Nantes, soutenu le 1^{er} juillet 2010 à Nantes.

Mélanie Piroux

Co-encadrement : Bastian S., **Lambert O.** Caractérisation de l'aire de butinage de l'Abeille domestique, *Apis mellifera*, et évaluation de l'exposition aux produits phytosanitaires et vétérinaires. Stage de Master II Cartographie et Gestion de l'Environnement, Université de Nantes, soutenu le 8 juillet 2009 à Nantes.

Annexe 2. Résultats bruts des dosages des pesticides dans les échantillons d'abeilles, de miel et de pollen par rucher et par période

Les résultats sont donnés par rucher, en fonction de la matrice apicole et par période. Les cases en noir correspondent à l'absence d'échantillons et les cases grises non renseignées à des échantillons pour lesquels aucune molécule n'a été détectée. Les concentrations sont données en ng/g. La méthode utilisée, les limites de détection (LOD) et de quantification sont données en partie 4.3. (Lambert *et al.*, soumis).

rucher A	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	carbendazime	<LOQ	flusilazole	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ
	coumaphos	<LOQ	phosmet	<LOQ	phosmet	<LOQ
			carbendazime	19,90	carbendazime	6,20
			amitraze II	12,20	carbaryl	5,20
			prochloraz	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
			pyriproxifène	<LOQ		
période 2	coumaphos	18,70	triphénylphosphate	<LOQ	phosmet	58,20
			phosmet	<LOQ		
période 3			coumaphos	<LOQ		
			carbendazime	<LOQ		
période 4	amitraze II	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 5	carbendazime	<LOQ	coumaphos	<LOQ		
période 6	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	<LOQ		
			phoxim	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
			pyriproxifène	<LOQ		
			héxythiazox	<LOQ		
période 7			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	<LOQ		
période 8			carbendazime	<LOQ	flusilazole	35,88

rucher B	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	phosalone	<LOQ	bupirimate	<LOQ	dimethoate	<LOQ
	carbendazime	10,20	tau-fluvalinate	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ
	amitraze II	<LOQ	amitraze I	<LOQ	carbendazime	132,10
			carbendazime	5,50	thiophanate-méthyl	1395,00
			amitraze II	38,60	carbaryl	1,60
			coumaphos	<LOQ		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
			pyriproxifène	<LOQ		
période 2			carbendazime	<LOQ	phosmet	35,90
			amitraze II	32,30	carbendazime	3,00
			carbaryl	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 3	butoxyde de pipéronyle	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	2,20
			amitraze II	12,70		
			coumaphos	<LOQ		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	phosmet	21,7	tau-fluvalinate	36,71
	tau-fluvalinate	28,70	carbendazime	<LOQ	carbendazime	21,24
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
	thiophanate-méthyl	<LOQ	coumaphos	<LOQ		
	butoxyde de pipéronyle	<LOQ				
période 5	carbendazime	39,80	carbendazime	<LOQ	carbendazime	2595,00
	thiophanate-méthyl	503,30	amitraze II	5,80	thiophanate-méthyl	3674,00
			thiophanate-méthyl	5,30		
			coumaphos	<LOQ		
période 6	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	7,30		
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 7	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 8	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze I	26,00	amitraze II	41,50
	amitraze I	29,60	carbendazime	<LOQ		
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	59,60		
	amitraze II	<LOQ				

rucher C	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	pollen	concentration
période 1	propiconazole	<LOQ	phosmet	<LOQ	carbendazime	6,70
			coumaphos	<LOQ	carbaryl	<LOQ
			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	65,6		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
période 2				dieldrin	<LOQ	
période 3			amitraze II	<LOQ		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 5	propiconazole	7,80				
	carbendazime	<LOQ				
	thiophanate-méthyl	<LOQ				
	carbaryl	<LOQ				
période 6			amitraze II	<LOQ		
période 7	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 8	triphénylphosphate	<LOQ	coumaphos	<LOQ		

rucher D	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	pollen	concentration
période 1	cypermethrine 1	48,80	carbendazime	40,50	carbendazime	70,40
	carbendazime	66,30	amitraze II	14,80	amitraze II	10,20
	thiophanate-méthyl	2418,70	thiophanate-méthyl	4,00		
période 2			coumaphos	14,40	carbendazime	2,20
			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	13,30		
			carbaryl	<LOQ		
			cyproconazole	<LOQ		
période 3	carbendazime	<LOQ	carbendazime	3,60	carbendazime	37,00
	coumaphos	<LOQ	amitraze II	13,50	diéthofencarbe	2,60
	héxythiazox	<LOQ	carbaryl	<LOQ	pyriproxifène	<LOQ
			diéthofencarbe	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
			chlorpyrifos-méthyl	<LOQ		
			pyriproxifène	<LOQ		
période 4	carbendazime	<LOQ			carbendazime	4,40
	amitraze II	<LOQ			amitraze II	<LOQ
	thiophanate-méthyl	<LOQ				
	coumaphos	<LOQ				
période 5	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	25,40	triadimenol	34,30
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	27,10	carbendazime	2,20
			coumaphos	<LOQ	amitraze II	<LOQ
période 6			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	5,70		
			coumaphos	<LOQ		
période 7			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	4,90		
			coumaphos	<LOQ		
période 8			carbendazime	<LOQ	vinclozoline	70,31
			amitraze II	6,00		
			coumaphos	<LOQ		

rucher E	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	pollen	concentration
période 1	chlorpyrifos	<LOQ	coumaphos	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ
	carbendazime	4,70	carbendazime	<LOQ	carbendazime	6,40
			chlorpyrifos-méthyl	<LOQ		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
		pyriproxifène	<LOQ			
période 2	carbendazime	<LOQ	phosmet	<LOQ	butoxyde de piperonyle	<LOQ
			carbendazime	<LOQ	carbendazime	2,50
			amitraze II	<LOQ	coumaphos	<LOQ
			coumaphos	<LOQ		
période 3			coumaphos	<LOQ	phosmet	<LOQ
			carbendazime	<LOQ	carbaryl	2,80
			amitraze II	<LOQ		
période 4	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			carbaryl	0,60		
			coumaphos	<LOQ		
période 5	carbendazime	<LOQ	tébuconazole	<LOQ		
	coumaphos	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 6	carbendazime	<LOQ	coumaphos	<LOQ		
période 7			carbendazime	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 8	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		

rucher F	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1			phosmet carbendazime amitraze II	42,10 <LOQ 25,80		
période 2	butoxyde de pipéronyle	<LOQ	phosmet carbendazime amitraze II carbaryl coumaphos	13,50 <LOQ <LOQ 4,10 <LOQ	phosmet	<LOQ
période 3			carbendazime amitraze II carbaryl coumaphos	<LOQ <LOQ <LOQ <LOQ		
période 4			amitraze I carbendazime amitraze II carbaryl coumaphos	<LOQ <LOQ 18,60 <LOQ <LOQ	amitraze II	23,50
période 5			amitraze II carbaryl coumaphos	41,10 <LOQ <LOQ		
période 6			amitraze II	5,00		
période 7			amitraze II coumaphos	4,60 <LOQ		
période 8	amitraze I amitraze II	<LOQ <LOQ	amitraze II coumaphos	<LOQ <LOQ		

rucher G	abeille		miel		pollen			
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration		
période 1	carbendazime	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	41,23		
	thiophanate-méthyl	<LOQ	carbendazime	<LOQ				
	pyriproxyfène	<LOQ	amitraze II	36,60				
période 2	carbendazime	<LOQ	phosmet	11,80	carbendazime	2,90		
			carbendazime	<LOQ				
			imidacloprid	<LOQ				
			amitraze II	22,20				
			cyproconazole	<LOQ				
			coumaphos	<LOQ				
période 3	cyperméthrine 1	28,50	endosulfan beta	<LOQ				
	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ				
			amitraze II	<LOQ				
			cyproconazole	<LOQ				
			coumaphos	<LOQ				
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ		
	tau-fluvalinate	11,00	amitraze II	<LOQ			tau-fluvalinate	29,30
	carbendazime	<LOQ						
période 5	triphénylphosphate	<LOQ	tau-fluvalinate	<LOQ	carbendazime	9,89		
	tau-fluvalinate	12,30	carbendazime	<LOQ				
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	4,20				
			cyproconazole	<LOQ				
			coumaphos	<LOQ				
période 6	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ				
	carbendazime	<LOQ	imidacloprid	<LOQ				
			amitraze II	<LOQ				
			cyproconazole	<LOQ				
			coumaphos	<LOQ				
période 7	triphénylphosphate	26,30	carbendazime	<LOQ				
	phosmet	62,20	amitraze II	<LOQ				
	tau-fluvalinate	<LOQ						
	carbendazime	<LOQ						
période 8	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze I	12,60	amitraze II	17,24		
	amitraze I	<LOQ	carbendazime	<LOQ				
	amitraze II	17,00	amitraze II	67,30				
			coumaphos	<LOQ				

rucher H	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	chlorpyrifos	<LOQ			bupirimate	<LOQ
	phosmet	<LOQ			triphénylphosphate	<LOQ
	carbendazime	<LOQ			carbendazime	5,30
	amitraze II	<LOQ			carbaryl	9,80
période 2	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ	phosmet	24,90
			amitraze II	24,50	carbendazime	<LOQ
			coumaphos	<LOQ		
période 3	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	13,90		
			coumaphos	<LOQ		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze II	15,70	triphénylphosphate	<LOQ
			coumaphos	<LOQ	amitraze II	19,70
période 5			amitraze II	102,80		
période 6	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	12,60		
			coumaphos	<LOQ		
période 7			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	8,50		
			coumaphos	<LOQ		
période 8			amitraze II	10,60		

rucher I	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	carbendazime	<LOQ	diazinon	14,00	carbendazime	9,20
	thiophanate-méthyl	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbofurane	2,30
	coumaphos	<LOQ	cyproconazole	<LOQ	coumaphos	<LOQ
période 2			coumaphos	6,00		
	coumaphos	<LOQ	carbendazime	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ
période 3			coumaphos	<LOQ	carbendazime	<LOQ
	carbendazime	<LOQ	diazinon	<LOQ		
période 4	coumaphos	<LOQ	carbendazime	4,10		
			phoxim	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
	triphénylphosphate	<LOQ	coumaphos	12,5	triphénylphosphate	<LOQ
période 5	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
	amitraze II	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
	coumaphos	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 6			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	3,90		
			coumaphos	<LOQ		
période 7			carbendazime	<LOQ		
	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze II	<LOQ		
	coumaphos	<LOQ	coumaphos	<LOQ		
période 8			carbendazime	<LOQ		
	amitraze I	<LOQ	amitraze II	11,70		
	amitraze II	<LOQ	coumaphos	<LOQ		

rucher IO	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	benalaxyl	<LOQ	buprofézine	42,80		
	amitrazé II	<LOQ	phosmet	10,20		
			coumaphos	<LOQ		
période 2			coumaphos	<LOQ		
période 3	triphénylphosphate	<LOQ	imazalil	<LOQ	triadiménol	35,40
			coumaphos	<LOQ	amitrazé I	115,20
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	coumaphos	<LOQ		
période 5					triphénylphosphate	<LOQ
période 6			coumaphos	<LOQ	pyriproxifène	<LOQ
			héxythiazox	<LOQ		
période 7	triphénylphosphate	<LOQ			amitrazé I	<LOQ
	amitrazé II	<LOQ				
période 8			buprofézine	<LOQ		

rucher IV	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	benalaxyl	<LOQ	coumaphos	23,60	triphénylphosphate	<LOQ
	coumaphos	47,30			coumaphos	39,10
	carbendazime	<LOQ			carbendazime	5,90
				carbaryl	4,50	
période 2	coumaphos	<LOQ	coumaphos	56,40	coumaphos	<LOQ
période 3	coumaphos	4,50	amitraze II	<LOQ	coumaphos	8,90
			coumaphos	7,20		
période 4	coumaphos	<LOQ	coumaphos	31,90	coumaphos	13,50
			amitraze II	<LOQ	pyriproxifène	<LOQ
période 5	triphénylphosphate	<LOQ	cyperméthrine 1	<LOQ	coumaphos	12,40
	coumaphos	<LOQ	coumaphos	29,50		
période 6	coumaphos	<LOQ	amitraze II	<LOQ	coumaphos	<LOQ
			coumaphos	3,60		
période 7	carbendazime	<LOQ	diazinon	>LOQ		
			coumaphos	10,20		
période 8	carbendazime	<LOQ	coumaphos	3,00		
	coumaphos	<LOQ				

rucher J	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	chlorpyrifos	180,20	flusilazole	<LOQ	chlorpyrifos	44,00
	flusilazole	<LOQ	tau-fluvalinate	30,00	flusilazole	51,60
	tau-fluvalinate	15,70	amitraze I	11,90	tau-fluvalinate	<LOQ
	carbendazime	16,00	carbendazime	87,90	carbendazime	31,30
	amitraze II	<LOQ	amitraze II	116,10	amitraze II	<LOQ
	coumaphos	<LOQ	cyproconazole	<LOQ	carbofurane	<LOQ
			coumaphos	3,40	coumaphos	<LOQ
période 2	triphénylphosphate	61,60	flusilazole	<LOQ	chlorpyrifos	<LOQ
	carbendazime	<LOQ	coumaphos	<LOQ	phosmet	33,40
	fénoxycarbe	20,10	carbendazime	10,80	carbendazime	1,90
	coumaphos	<LOQ	amitraze II	43,60	amitraze II	6,90
			cyproconazole	<LOQ	coumaphos	<LOQ
période 3	triphénylphosphate	10,10	coumaphos	<LOQ	chlorpyrifos	<LOQ
			carbendazime	4,50	phosmet	78,10
			amitraze II	6,30		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ			chlorpyrifos	139,50
	tau-fluvalinate	46,80				
	amitraze I	<LOQ				
	amitraze II	<LOQ				
période 5	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ	tau-fluvalinate	85,42
	coumaphos	<LOQ	amitraze II	9,30	carbendazime	28,10
			cyproconazole	<LOQ	amitraze II	129,40
			coumaphos	3,50	coumaphos	40,40
période 6	chlorpyrifos	<LOQ	coumaphos	<LOQ	chlorpyrifos	<LOQ
	coumaphos	16,20	carbendazime	<LOQ	carbendazime	1,20
	tau-fluvalinate	15,20	amitraze II	6,50	amitraze II	1,60
	carbendazime	<LOQ	cyproconazole	<LOQ	coumaphos	<LOQ
période 7	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ
	coumaphos	<LOQ	amitraze II	<LOQ	iprodione	<LOQ
			cyproconazole	<LOQ	pyriproxifène	<LOQ
			coumaphos	<LOQ		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
période 8	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		

rucher K	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	carbendazime	<LOQ	bupirimate carbendazime	<LOQ <LOQ	carbendazime	12,35
période 2	carbendazime	<LOQ	phosmet carbendazime amitraze II coumaphos butoxyde de pipéronyle	12,00 <LOQ <LOQ <LOQ <LOQ	carbendazime	2,20
période 3	carbendazime	<LOQ	carbendazime amitraze II imazalil coumaphos	<LOQ <LOQ <LOQ <LOQ		
période 4	carbendazime	<LOQ	carbendazime amitraze II	<LOQ <LOQ	imidacloprid pyriproxifène	<LOQ <LOQ
période 5			carbendazime amitraze II coumaphos	<LOQ <LOQ <LOQ		
période 6			carbendazime coumaphos	<LOQ <LOQ		
période 7	carbendazime	<LOQ	carbendazime amitraze II	<LOQ <LOQ		
période 8			amitraze II coumaphos	<LOQ <LOQ		

rucher L	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	flusilazole	<LOQ	phosmet	<LOQ	flusilazole	19,90
	carbendazime	<LOQ	coumaphos	<LOQ	carbendazime	9,20
	coumaphos	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	<LOQ		
		butoxyde de pipéronyle	<LOQ			
période 2	coumaphos	<LOQ	phosmet	<LOQ	carbendazime	2,00
			carbendazime	<LOQ		
			carbofurane	<LOQ		
			cyproconazole	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 3			carbendazime	<LOQ	phosmet	29,90
			amitraze II	<LOQ		
			imazalil	<LOQ		
			carbofurane	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 4	tau-fluvalinate	<LOQ				
	amitraze I	<LOQ				
	amitraze II	<LOQ				
période 5	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze II	19,40	pyriproxifène	<LOQ
	carbendazime	<LOQ	coumaphos	3,80		
	thiophanate-méthyl	<LOQ				
période 6	triphénylphosphate	<LOQ	phosmet	25,80		
	phosmet	<LOQ	tau-fluvalinate	<LOQ		
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	8,90		
	coumaphos	<LOQ	cyproconazole	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 7	coumaphos	<LOQ	amitraze II	5,60		
période 8			amitraze II	10,70		
			coumaphos	<LOQ		

rucher M	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	carbendazime	<LOQ	carbendazime amitraze II coumaphos	<LOQ 4,70 <LOQ	carbendazime carbaryl	9,88 14,67
période 2	carbendazime	<LOQ	phosmet carbendazime amitraze II coumaphos	9,90 <LOQ 4,10 <LOQ		
période 3			carbendazime amitraze II imazalil coumaphos	<LOQ 5,50 <LOQ <LOQ		
période 4	tau-fluvalinate	52,90	phosmet carbendazime amitraze II coumaphos	10,10 <LOQ <LOQ <LOQ	coumaphos	<LOQ
période 5	carbendazime	<LOQ	imidacloprid amitraze II coumaphos	<LOQ 9,40 <LOQ		
période 6			carbendazime amitraze II coumaphos	<LOQ <LOQ <LOQ		
période 7						
période 8	triphénylphosphate	<LOQ	coumaphos	<LOQ		

rucher N	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	carbendazime	<LOQ	phosmet	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ
	amitraze II	7,00	coumaphos	<LOQ	carbendazime	6,30
			carbendazime	<LOQ	amitraze II	<LOQ
			amitraze II	27,20	carbaryl	5,60
			carbaryl	<LOQ		
période 2	carbendazime	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	1,90
	carbaryl	<LOQ	phosmet	<LOQ	amitraze II	<LOQ
			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	18,50		
			coumaphos	<LOQ		
			butoxyde de pipéronylke	<LOQ		
période 3	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	2,00
	carbendazime	<LOQ	amitraze II	9,90		
			imazalil	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ
	amitraze I	<LOQ	amitraze II	20,70		
	carbendazime	<LOQ	coumaphos	<LOQ		
	amitraze II	<LOQ				
période 5	diazinon	<LOQ	carbendazime	<LOQ	amitraze II	<LOQ
	amitraze II	15,00	amitraze II	60,30		
période 6	chlorpyrifos	<LOQ	amitraze II	10,00	carbendazime	1,48
	phosmet	<LOQ	coumaphos	<LOQ	amitraze II	74,99
	carbendazime	<LOQ				
	amitraze II	<LOQ				
période 7	amitraze II	<LOQ	amitraze II	12,20		
période 8	amitraze II	<LOQ	amitraze II	14,70	amitraze II	38,90

rucher O	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1			coumaphos	<LOQ	triphénylphosphate	<LOQ
			tau-fluvalinate	15,00	carbendazime	4,60
			amitraze I	<LOQ	carbaryl	1,60
			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	37,60		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
période 2	carbendazime	<LOQ	phosmet	<LOQ	carbendazime	<LOQ
			carbendazime	<LOQ	amitraze II	<LOQ
			amitraze II	19,60		
			carbofurane	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
			butoxyde de pipéronyle	<LOQ		
période 3	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ	triadimenol	35,70
			amitraze II	4,40		
			imazalil	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 4	amitraze II	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ
			amitraze II	10,90	amitraze II	26,00
			coumaphos	<LOQ		
période 5	triphénylphosphate	<LOQ	amitraze II	71,80		
	pyriproxifène	<LOQ	fénoxycarbe	<LOQ		
			prochloraz	<LOQ		
période 6			tau-fluvalinate	<LOQ		
			amitraze II	12,90		
			coumaphos	<LOQ		
période 7			carbendazime	<LOQ		
			amitraze II	10,80		
période 8	tau-fluvalinate	42,40	tau-fluvalinate	<LOQ		
			amitraze II	<LOQ		

rucher P	abeille		miel		pollen	
	molécule	concentration	molécule	concentration	molécule	concentration
période 1	carbendazime	<LOQ	cyproconazole	3,80	carbendazime	6,67
	carbaryl	<LOQ	carbendazime	5,20	carbaryl	<LOQ
			coumaphos	<LOQ		
période 2	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	2,50
			cyproconazole	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 3	triphénylphosphate	<LOQ	phoxim	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 4	triphénylphosphate	<LOQ	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ
			cyproconazole	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
période 5			carbendazime	<LOQ	carbendazime	13,86
			coumaphos	<LOQ		
			butoyde de pipéronyle	<LOQ		
période 6			carbendazime	<LOQ		
			coumaphos	<LOQ		
			butoyde de pipéronyle	<LOQ		
période 7	carbendazime	<LOQ	carbendazime	<LOQ		
période 8			coumaphos	<LOQ		

Annexe 3. Profils de contamination dans la matrice abeilles

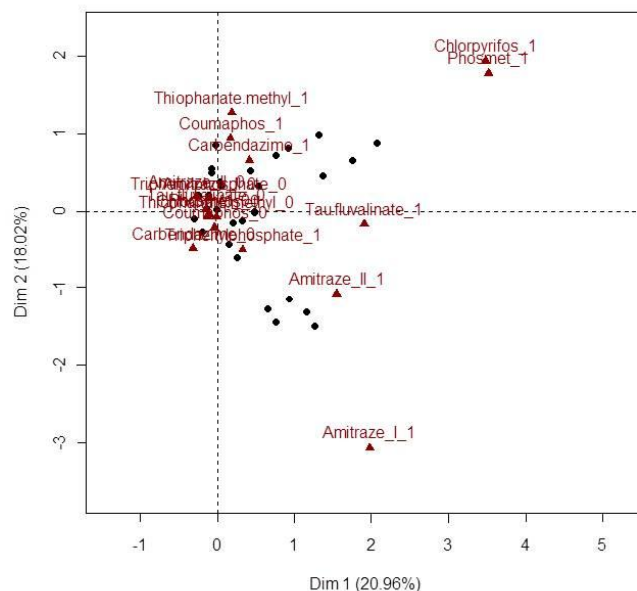


Figure 1 Annexe 3. Premier plan factoriel de l'Analyse des Correspondances Multiples sur les échantillons d'abeilles. Représentation des variables actives (molécules). Les échantillons sont représentés par les points noirs.

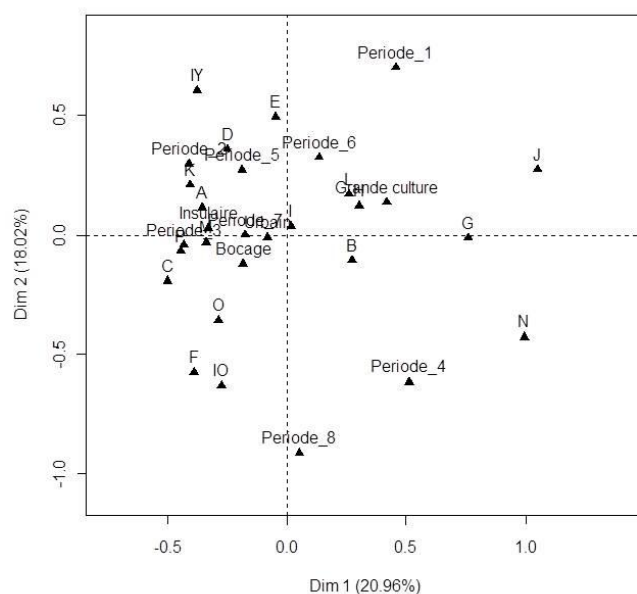


Figure 2 Annexe 3. Premier plan factoriel de l'Analyse des Correspondances Multiples sur les échantillons d'abeilles. Représentation des variables supplémentaires (rucher, paysage, période).

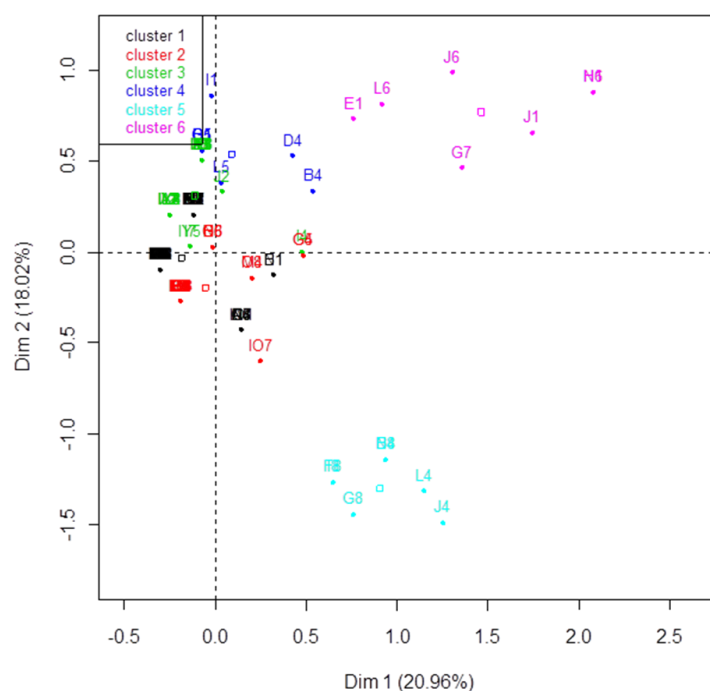


Figure 3 Annexe 3. Classification Ascendante Hiérarchique des échantillons d'abeilles (identifiés par une lettre, de A à P correspondant au rucher, et un chiffre de 1 à 8, correspondant à la période ; exemple J1 = rucher 1 période1) en fonction de leurs profils de contamination, et regroupement des clusters par classe.

Tableau 1 Annexe 3. Description des classes d'échantillons obtenues à partir de la Classification Ascendante Hiérarchique.

classe	Modalités sur-représentées	Modalités sous-représentées
1 (n=73)	Triphénylphosphate_0, Coumaphos_0, Tau-fluvalinate_0, Thiophanate-méthyl_0, Chlorpyrifos_0, Amitraze_I_0, Rucher K, Urbain	Amitraze_I_1, Thiophanate-méthyl_1, Tau-fluvalinate_1, Coumaphos_1, Triphénylphosphate_1, Rucher J, Grande Culture
2 (n=25)	Triphénylphosphate_1, Coumaphos_0	Coumaphos_1, Triphénylphosphate_0, Période_2, Période_1
3 (n=21)	Coumaphos_1, Rucher IY et I, Insulaire	Coumaphos_0, Urbain
4 (n=8)	Thiophanate-méthyl_1, Carbendazime_1, Grande culture	Carbendazime_0, Thiophanate-méthyl_0
5 (n=7)	Amitraze_I_1, Amitraze_II_1, Période 8	Amitraze_I_0, Amitraze_II_0
6 (n=7)	Chlorpyrifos_1, Phosmet_1, Carbendazime_1, Tau-fluvalinate_1	Tau-fluvalinate_0, Carbendazime_0, Phosmet_0, Chlorpyrifos_0

Annexe 4. Questionnaire à destination des professionnels agricoles afin de récolter les informations relatives à l'utilisation des substances à usages phytosanitaires

PROFESSIONNEL AGRICOLE	Nom, prénom	ENQUÊTE ABEILLE SENTINELLE ANNEE 2008 DATE	RUCHER	N°
	Tél ou mail			Apiculteur
	Adresse			Commune
	Taille totale exploitation			Type paysage

DONNEES PARCELLES					DONNEES PRODUITS PHYTOSANITAIRES						REMARQUES
Surface totale	îlot PAC	cultures			dates des traitements	surface traitée	nom commercial	Dose g/ha ou l/ha	mode d'épandage	moment de la journée	vitesse vent, T°, pluviométrie
		Espèces (nom de la semence)	date mise en culture	date récolte							

Annexe 5. Evaluation de la toxicité pour l'Homme des résidus de traitements phytosanitaires et vétérinaires retrouvés dans les échantillons de miel collectés dans le cadre de cette étude

Il a été considéré pour ce calcul que l'Homme consomme quotidiennement 20 g de miel, selon la ration alimentaire quotidienne théorique maximale standardisée.

Tableau annexe 1. Toxicité pour l'Homme (de 60 kg) des pesticides retrouvés dans les miels récoltés

molécules	Concentration maximale mesurée (ng/g miel frais)	Dose d'exposition (ng/kg poids corporel/j)	DJA* (mg/kg poids corporel/j)	Part de la DJA apportée par le miel (%)
Amitraze I	26,00	8,6667	0,0100	0,087
Amitraze II	116,10	38,7000	0,0100	0,387
Bupirimate	14,20	4,7333	0,0500	0,009
Buprofézine	42,80	14,2667	0,0100	0,143
Butoxyde de pipéronyl	9,00	3,0000	0,2000	0,002
Carbaryl	4,10	1,3667	0,0075	0,018
Carbendazime	87,90	29,3000	0,0200	0,147
Carbofuran	3,80	1,2667	0,0010	0,127
Chlorpyrifos-méthyl	5,20	1,7333	0,0100	0,017
Coumaphos	56,40	18,8000	ND*	NC*
Cyperméthrine	37,60	12,5333	0,0150	0,084
Cyproconazole	3,80	1,2667	0,0200	0,006
Diazinon	14,00	4,6667	0,0002	2,333
Diéthofencarbe	3,80	1,2667	0,1700	0,001
Endosulfan beta	30,9	10,3000	0,0060	0,172
Fénoxycarbe	4,1	1,3667	0,0600	0,002
Flusilazole	10,30	3,4333	0,0020	0,172
Héxythiazox	4,00	1,3333	0,0300	0,004
Imazalil	4,10	1,3667	0,0250	0,005
Imidaclopride	3,90	1,3000	0,0600	0,002
Phosmet	42,10	14,0333	0,0100	0,140
Phoxim	7,30	2,4333	0,0040	0,061
Prochloraz	11,40	3,8000	0,0100	0,038
Pyriproxyfène	4,30	1,4333	0,1000	0,001
Tau-fluvalinate	30,00	10,0000	0,0400	0,025
Tébuconazole	25,60	8,5333	0,0300	0,028
Thiophanate-méthyl	5,30	1,7667	0,0800	0,002
Triphénylphosphate	9,3	3,1000	ND	NC

*DJA : dose journalière admissible ; ND : non déterminée ; NC : non calculée

Annexe 6. Etude de terrain de la prévalence de 12 agents infectieux dans 18 ruchers de l'Ouest de la France

Cette partie a fait l'objet d'un article soumis en juin 2012 dans la revue **Applied and Environmental Microbiology** (Mouret *et al.*, soumis).

A field study of the prevalence of 12 infectious agents in 18 apiaries in western France

Coralie Mouret^{1#}, Olivier Lambert¹, Mélanie Piroux¹, François Beaudeau^{3,4}, Bertille Provost², Pauline Bénét², Marc-Edouard Colin², Monique L'Hostis¹

¹ LUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Plateforme Environnementale Vétérinaire, Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Écosystèmes des Pays de la Loire (CVFSE), Atlanpole - La Chantrerie, BP 40706, Nantes F-44307, France

² Montpellier SupAgro (Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques), Laboratoire de Pathovigilance et de Développement Apicole, Unité de Services, d'Analyses et d'Expertises, Domaine de la Valette, 900 rue Jean-François Breton, Montpellier, F-34090, France

³ INRA, UMR 1300 BIOEPAR, Nantes, F-44307, France

⁴ LUNAM Université, ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Plateforme Environnementale Vétérinaire, UMR ONIRIS/INRA « Bioepar », Atlanpole-La Chantrerie, BP 40706, Nantes F-44307, France

Corresponding author: mouret.coralie@gmail.com

