

LA PHARMACODYNAMIE DE L'ACIDE OXALIQUE DANS LA COLONIE D'ABEILLES MELLIFÈRES

A. NANETTI, Italia, email: istnapic@inapiucoltura.org³
P. BARTOLOMEI, Italia, email: istnapic@inapicoltura.org¹
Stefania BELLATO, Italia, email: istnapic@inapicoltura.org²
Maria De SALVIO, Italia, email: istnapic@inapicoltura.org²
E. GATTAVECCHIA, Italia, email: istnapic@inapicoltura.org²
R., Italia, email: ghini@biocfarm.unibo.it²

¹ E.N.E.A. – U.F.I.S sede di Montecuccolino, Bologne

² U.C.I. Scienze Chimiche, Radiochimiche e Metallurgiche, Facoltà di Farmacia, Università di Bologna, tel.: +39 051 353103

³ Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologne

Resumé

La pharmacodynamie de l'acide oxalique (AO) administré par dégouttement a été étudiée à l'aide des méthodes radiochimiques. Un sirop de sucre, contenant de l'AO marqué par C14, a été versé goutte à goutte dans une colonie, en conformité avec la dose et la technique communément utilisées dans la pratique apicole. Dans les premiers quatre jours, la contamination des abeilles adultes a atteint 118 microg/g, mais après deux semaines de traitement, elle a baissé à moins de 1/10 et de 1/60 respectivement. Pendant les mois suivants, on a enregistré une baisse nouvelle. On a mesuré des niveaux considérablement plus bas chez le couvain de 8-9 jours, qu'on a contaminés aussi temporairement. Les radiographies ont mis en évidence la présence de l'AO dans les organes abdominaux internes des abeilles adultes.

Dans le miel fraîchement récolté, l'augmentation de l'AO a été de 0,6 mg/kg ou encore moins. Cela ne représente qu'une petite fraction du contenu naturel en AO du miel. Le marqueur radioactif a été trouvé également dans la cire amassée dans les rayons bâtis, mais ce n'est pas clair si sa présence était due à la contamination directe, impliquant une réaction chimique entre l'AO et la cire ou à l'existence des métabolites formés chez les abeilles à partir de l'AO ingéré.

Dans une deuxième expérience, menée conformément à la même méthode d'administration, on a pris aussi en considération d'autres matrices. Le marqueur radioactif a été présent tout aussi bien dans l'hémolymphe de l'abeille adulte que dans les échantillons de CO₂ prélevés dans la colonie. Ce fait semble confirmer l'hypothèse de la métabolisation de l'AO par les abeilles.

Mots-clés: Varroa, résidus, acide oxalique, distribution

Introduction

Déverser goutte à goutte de la solution de sucre à laquelle on a ajouté de l'acide oxalique (NANETTI et STRADI, 1997) est une méthode courante employée dans beaucoup de pays européens pour combattre la varroose dans les colonies d'abeilles. On a effectué de nombreuses expériences ayant pour but de vérifier l'efficacité et la tolérabilité de cette méthode, dans une multitude de conditions techniques et environnementales, expériences qui ont souvent conduit à la mise en place de structures méthodologiques locales (NANETTI, 2002).

Pourtant, nos connaissances sur l'ingrédient actif sont loin d'être complètes. On connaît par exemple très peu de choses sur l'action de l'acide oxalique à l'intérieur de la colonie d'abeilles et sur les abeilles prises individuellement. La compréhension de ce phénomène, au-delà de l'intérêt purement académique, est vitale en vue de l'entendement des effets négatifs du traitement et de l'amélioration des méthodes d'application. Le nombre réduit de données disponibles concernant les résidus qui sont restés dans le miel, montre d'habitude un risque bas de la préservation de la pureté du miel à la suite du traitement à acide oxalique (MUTINELLI *et al.*, 1997; DEL NOZAL, M.J. *et al.*, 2000; BERNARDINI, M. et GARDI, T., 2001; BOGDANOV *et al.*, 2002; NANETTI, A. *et al.*, 2002). Malgré cela, les techniques analytiques qu'on emploie d'habitude ne sont pas à même de faire la distinction entre la contamination avec acide oxalique et celle avec l'acide compris de façon habituelle dans le miel, cela dépendant largement de son origine botanique de celle-ci (MUTINELLI *et al.*, 1997; NANETTI, A. *et al.*, 2002).

La présente étude se veut une contribution à l'enrichissement de ces connaissances. Comment dépasser l'obstacle représenté par la présence naturelle de cette substance dans différentes matrices de la

colonie d'abeilles et la distribution de l'acide oxalique ont été les problèmes qu'on a étudiés en administrant de la solution marquée C₁₄ et en effectuant d'autres analyses radiochimiques.

Matériel et méthodes

L'expérimentation a consisté dans deux mesures, effectuées sur toute la durée de la saison estivale des années 1999 et 2002 respectivement, dans la proximité de la ville de Bologne, Italie, pendant la récolte du miel. Dans chaque année, on a employé une seule colonie qu'on a hébergée dans ruche DB. Dans les deux colonies, les abeilles occupaient tous les 10 rayons disponibles, dont 6-7 contenaient du couvain.

Le 19 juillet 1999 et respectivement, le 28 juillet 2002, les colonies ont été traitées avec acide oxalique, par la méthode du dégouttement, mentionnée plus haut. Les traitements ont consisté dans 50 et 41 ml solution hydrique où il y avait 4,2% acide oxalique et 60% sucre alimentaire (poids/volume), administrée à l'aide d'une seringue. On a ajouté en préalable à la solution de l'acide oxalique avec C₁₄ (Sigma N.31, 391-2), dans des quantités correspondant à 12,1 MBq et à 7,4 MBq respectivement.

Pour les deux mesures, les échantillons précédant le traitement ont été ramassés dans les matrices mentionnées ci-dessous. Les échantillons après le traitement ont été collectés une fois initialement (1999) ou deux fois dans la journée (à 7 du matin et à 8 de l'après-midi, en 2002), mais, plus tard, on les a prélevés à des intervalles plus longues.

En 1999, on a pris en considération les matrices suivantes :

- abeilles adultes des rayons latéraux ;
- couvain à l'âge de 8-9 jours ;
- miel désoperculé ;
- cire des murs latéraux des cellules nouvellement bâties (on a utilisé un rayon artificiel).

En 2002, on a prélevé des échantillons :

- des abeilles adultes des rayons latéraux ;
- du CO₂ de l'air à l'intérieur de la colonie ;
- de la cire des rayons nouvellement bâtis ;
- du miel frais, déposé dans des rayons nouveaux.

On a prélevé des spécimens d'hémolymphe thoracique chez les abeilles collectées pendant l'été de 2002, en se servant des pipettes capillaires Pasteur (FLURI *et al.*, 1981), dans des tubes Eppendorf. Les ailes antérieures de chaque abeille ont été coupées et fixées sur les lamelles d'un microscope la partie extérieure en haut ; les ailes de la partie droite ont été laissées comme telles, et celles de la gauche ont été lavées en abondance avec de l'eau distillée.

Les intestines de d'autres abeilles ont été extraits en ôtant avec attention l'aiguillon à l'aide d'une paire de tenailles. Par la suite, on les a mis sur les lamelles du microscope et on les a déposés à 40°C environ jusqu'à l'utilisation, pour qu'elles sèchent lentement. En vue de diminuer la densité de la préparation, les poches à miel des abeilles ont été vidées en les pressant lentement.

Pour offrir à la reine un plus d'espace pour déposer ses œufs, on a enlevé au 5ème jour de l'expérimentation de 2002 un rayon de miel latéral et on l'a remplacé avec un autre, vide. Avant le commencement du traitement, seulement la partie supérieure du rayon contenait du miel. Par la suite, le rayon a été progressivement rempli jusque vers le centre où il y avait encore une zone de cellules de miel encore désoperculées avant qu'elle ne soit enlevée. Pour collecter des échantillons de CO₂ de la colonie, on a monté à l'intérieur de la ruche un tube en plastique, le bout extérieur duquel a été couvert par un bouchon, l'autre bout se trouvant à l'intérieur du nid de couvain. On a pris des mesures de précaution pour éviter l'entrée par accident dans le tube des abeilles et des gouttes de solution. Quatre litres d'air passés par le bouchon extérieur ont été laissés friller lentement dans un autre tube contenant 5 ml de hydroxide de hyamine 10-X (1 M en méthanol ; catalogue Packard no. 6003005).

Tous les échantillons, exception faisant les ailes, les intestines et les rayons de miel, ont été congelés (à environ 25°C), jusqu'au moment de l'analyse.

On a fait des autoradiographies des ailes lavées ou non, des intestines sèches et des rayons de miel enlevés le 5ème jour. L'exposition a duré 33 et 23 jours respectivement pour les premières trois matrices et les rayons respectivement. Pour intensifier l'adhésion au film, le rayon a été mis sur une de ses parties latérales. Les fuites de miel ont été évitées, en effectuant la radiographie à environ -25°C. Les spécimens ont été enveloppés dans un film de polythène (d'environ 10 m), pour éviter le contact direct avec l'émulsion photosensible. On a utilisé des films Kodak Biomax MR1 qu'on a traités conformément aux indications du producteur.

Le mesurage de la radioactivité (instruments et préparation des échantillons)

Tous les mesurages de la radioactivité ont été faits par scintillation liquide (LSC), dans un compteur Quantulus 1220 (LKB, Suède). On a utilisé des fioles de 20 ml scintillation Ultima Gold, couvertes par une couche de téflon et par un mélange de (Packard Canberra, Etats-Unis).

Cinq abeilles lyophilisées ont été précisément pesées, moulues et suspendues dans un volume connu d'acide oxalique froid. La suspension a été ultrasoniquée pendant 10 min., chauffée à 70-80°C et centrifugée. Un millimètre de surnageant a été ajouté à 18 ml de mélange scintillant, dans une fiole de 20 ml. Une aliquote (=qui se divise exactement par un nombre pair, sans reste – NT) de miel, ayant 0,2 g, à peu près, a été pesée avec exactitude, dans une fiole de scintillation et diluée de l'eau (1 ml environ) ; on y a ajouté par la suite 18 ml de mélange de scintillation.

À peu près 0,1 g (mesuré avec exactitude) de cire a été dissoute dans 25 ml de cyclohexane et ensuite ultrasoniquée. On a ajouté un ml de solution à 18 ml de mélange de scintillation, dans une fiole de 20 ml.

Un échantillon de couvain à l'âge de 8-9 jours a été pesé avec précision et suspendu dans 5 ml d'acide oxalique froid, ultrasoniqué ensuite pendant 10 min., chauffé à 60°C, pendant 10 min. et centrifugé. Trois gouttes de trichloracétique ont été ajoutées pour permettre la clarification de la solution. À la suite de la deuxième centrifugation, 1 ml de surnageant a été ajouté à 18 ml de mélange de scintillation, dans une fiole de 20 ml.

Un échantillon de pollen pesé a été suspendu dans 5 ml d'acide oxalique froid, ultrasoniqué par la suite pendant 10 min., chauffé à 80°C, pendant encore 10 min. et centrifugé. Le surnageant a été filtré par un microfiltre de 0,1 m. Un millilitre de la solution résultée a été ajouté à 18 ml de mélange de scintillation, dans une fiole de 20 ml. Une quantité de 1 ml de hydroxide de hyamine 10-X, collectée dans le piège de CO₂ décrit ci-dessus, a été ajoutée à 18 ml de mélange de scintillation, dans une fiole de 20 ml.

L'hémolymphe a été précisément pesée et complètement transférée, par des quantités successives de mélange de scintillation, jusqu'à un volume total de 3 ml, dans une fiole contenant 16 ml de mélange de scintillation.

La chromatographie de la cire

Un échantillon de cire, collecté au pic de la radioactivité, a été dissout en cyclohexane et analysé par TLC (silica gel, Merck). Après l'évaluation à acide acétique, on a établi la distribution de la radioactivité à l'aide d'un dispositif radio de balayage (dispositif de balayage linéaire TLC, Berthold, Allemagne).

Résultats et discussions

Les abeilles adultes et le couvain

La Figure 1 montre qu'une contamination remarquable des abeilles adultes a été dépistée à 24 heures après le traitement de 1999. Un jour plus tard, la valeur maximale atteinte a été de 118 g /g, mais d'autres baisses plus importantes sont survenues le 7ème et le 11ème jour, lorsqu'on a identifié des teneurs

de 10,8 et 2,0 g /g respectivement. Si le poids moyen d'environ 100 mg d'une abeille est pris comme valeur de référence, la contamination avec acide oxalique s'est située aux alentours de 12 g , 1 g et de 0,2 g respectivement. D'autres baisses graduelles sont apparues au cours des mois suivants.

Figure 1. Contaminating oxalic acid in adult honey bees and in 8-9 day old brood.

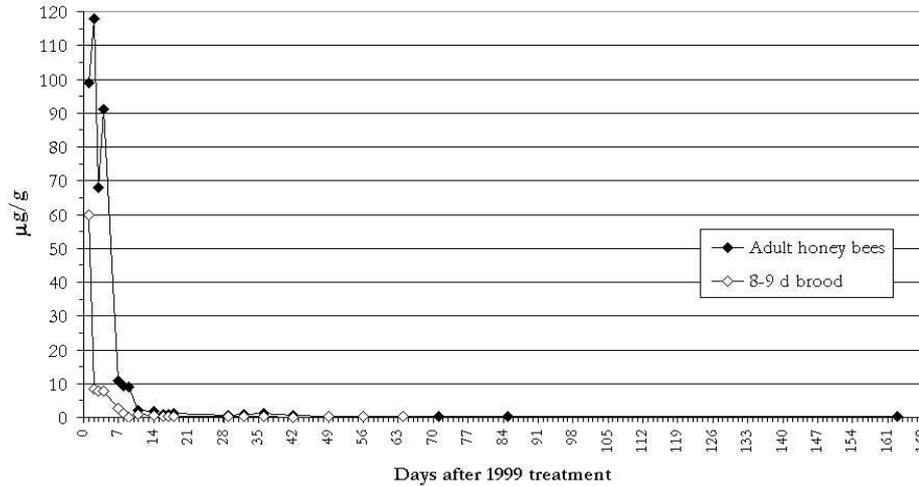


Fig. 1 - La contamination avec acide oxalique chez les abeilles adultes et le couvain de 8-9 jours (sur l'abscisse) g/ g

(dans le diagramme) abeilles adultes
 couvain de 8-9 jours
 (en bas) jours après le traitement de 1999

Une contamination plus réduite s'est produite chez le couvain plus âgé, operculé, la valeur maximale touchant 60 g /g. Tout comme chez les abeilles adultes, le pic a été enregistré à 24 heures après le traitement.

Pourtant, en comparaison avec les abeilles, la baisse a commencé plus tôt, la valeur se stabilisant par la suite à des niveaux bas.

Ultérieurement, on a pu démontrer la présence de l'acide oxalique C₁₄ dans l'hémolymphe des abeilles mellifères. La plus haute valeur (10 ng/mg) a été enregistrée à 12 heures après le traitement, mais une chute abrupte a surgi par la suite, menant à une concentration de 1,1 ng/mg à la 84ème heure. La radioactivité s'est estompée presque complètement à un mois environ après le traitement (Figure 2).

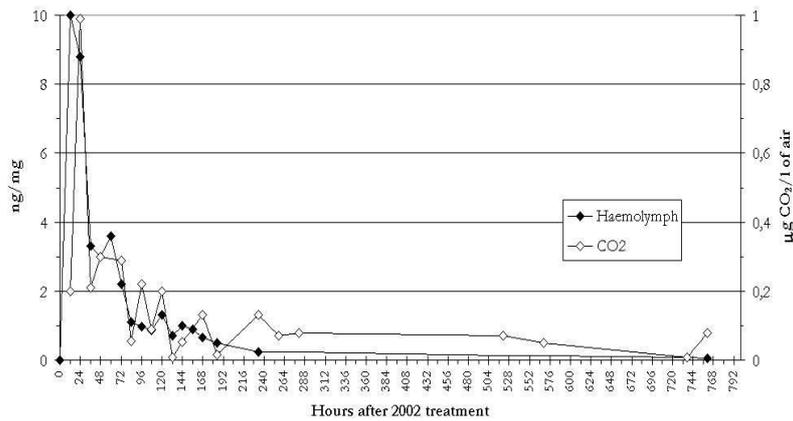
Figure 2. Contaminating oxalic acid in honey bee haemolymph (left) and in CO₂ (right).

Fig. 2 - La contamination avec acide oxalique dans l'hémolymphe des abeilles (à gauche) dans le CO₂ (à droite)

(à gauche.) ng/mg

(à droite) µg CO₂/litre d'air

(dans le diagramme) Hémolymphe

CO₂

(en bas) Heures, après le traitement de 2002

De petites différences, s'il y en a eu, se sont produites dans les autoradiographies des ailes non lavées, et des ailes où on a enlevé l'acide oxalique par un lavage attentif. Les deux catégories d'ailes ont laissé sur le film les traces de leur propres nervures. Ce fait semble indiquer une contamination extérieure réduite chez les abeilles et correspond à la détection de la contamination avec acide oxalique de l'hémolymphe qui remplit les nervures des ailes.

L'hypothèse de la métabolisation de l'acide oxalique par les abeilles est soutenue par le dépistage du CO₂ radioactif dans l'air examiné à l'intérieur de la colonie (Fig. 2), le pic de la concentration duquel a été attardé, en comparaison avec celui enregistré dans l'hémolymphe.

Une baisse soudaine est survenue, suivie par un cycle journalier, avec des pointes positives de l'air duquel on a prélevé de spécimens au soir, et des valeurs réduites tôt pendant le matin. Bien qu'aucune explication qui ne soit ambiguë puisse être donnée quant à ce phénomène, le niveau différent de l'activité de la colonie pendant la période de la journée et celle de la nuit, pourrait avoir eu une certaine influence.

La Figure 3 présente la distribution de la radioactivité au long des intestines des abeilles. À 12 heures après le traitement, tous les tractus intestinaux entre la poche à miel et le rectum ont mis en évidence la présence du marqueur, mais par la suite, la présence du marqueur radioactif a été dépistée seulement occasionnellement à l'intérieur des poches à miel. En général, la contamination s'est réduite avec le temps ; les intestines collectés pendant la 22^{ème} et la 31^{ème} journées n'étaient pas contaminés en quantités détectables.

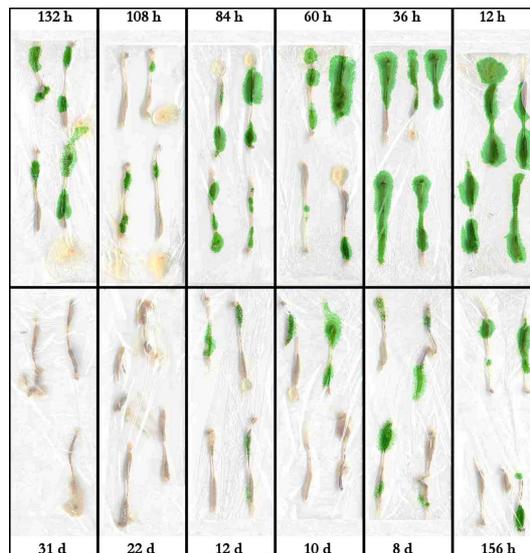


Fig. 3 - La radioactivité dans les intestines de l'abeille mellifère (les zones colorées)

La cire et les rayons de miel

La Figure 4 présente la radioactivité détectée dans les échantillons de cire en 1999. Si l'on compare les abeilles adultes avec le couvain, le pic a une journée de retard. Malgré la propriété hydrophile de l'acide oxalique, on a détecté la présence du marqueur radioactif (C_{14}), toujours à long terme. Les analyses TLC, faites sur certains de ces échantillons semblent montrer que la fraction radioactive de la cire consiste en plus d'un seul composant. Cela pourrait signifier qu'après le traitement, non seulement les cristaux d'acide oxalique puissent arriver sur les rayons, mais aussi que l'acide réagit avec la cire et / ou que le métabolites de l'acide oxalique prendraient la voie qui mène à la synthèse d'un certain composant de la cire chez les abeilles qui sécrètent de la cire.

Figure 4. β -activity in new wax collected from pre-existing combs.

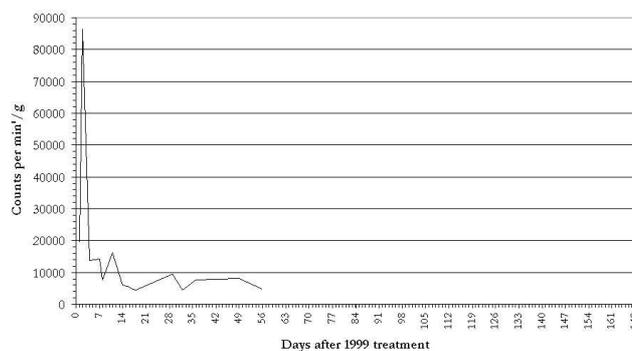


Fig. 4 - Activité du nouveau cire, collecté dans les rayons existants déjà

(à gauche) désintégration per min¹ /g
(en bas) jours après le traitement de 1999

Constamment, la radioactivité de 2002 a été dépistée dans les échantillons de cire fraîche, toujours à long terme. Dans la Figure 5, tous les signaux enregistrés sont convertis dans des concentrations de l'acide oxalique, mais dans ce cas également, des quantités inconnues de composants provenant des réactions chimiques et / ou de la métabolisation pourraient être présentes, ce qui est probable de mener à une appréciation plus une moins incorrecte de la contamination. L'hypothèse selon laquelle les abeilles métaboliseraient elles-mêmes l'acide oxalique, correspond à l'existence à la fois des pics enregistrés dans la cire et dans le CO₂.

Figure 5. Contaminating oxalic acid in wax (see text) and honey.

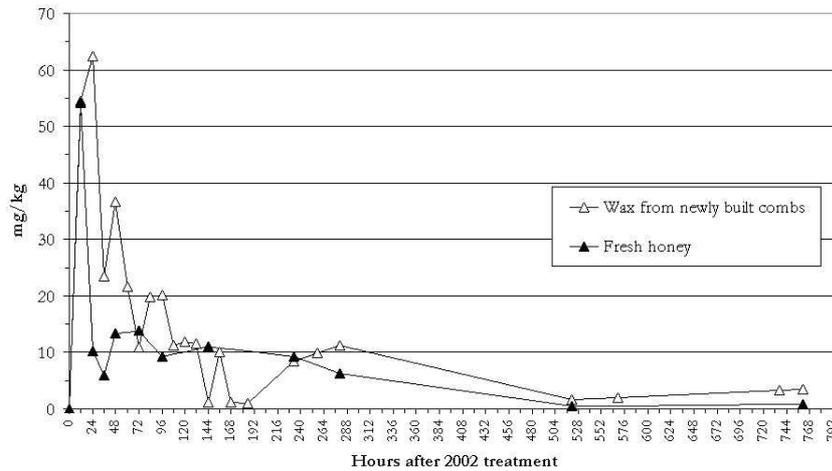


Fig. 5 - La contamination de la cire (voir le texte) et du miel avec acide oxalique

(à gauche) mg/kg

(dans le diagramme) Cire des rayons nouvellement bâtis

Miel frais

(en bas) Heures, après le traitement de 2002

L'autoradiographie faite sur les rayons de miel (Fig. 6) montre que le marqueur radioactif s'est éparpillé sur la surface du rayon (un rayon de miel non contaminé n'a pas laissé de traces sur le film). La zone de couleur foncée en haut se trouve tout près de l'endroit d'administration. Dans les cellules de miel désoperculées, la contamination a semblé plus élevée sur les marges de la cellule, que dans le miel.

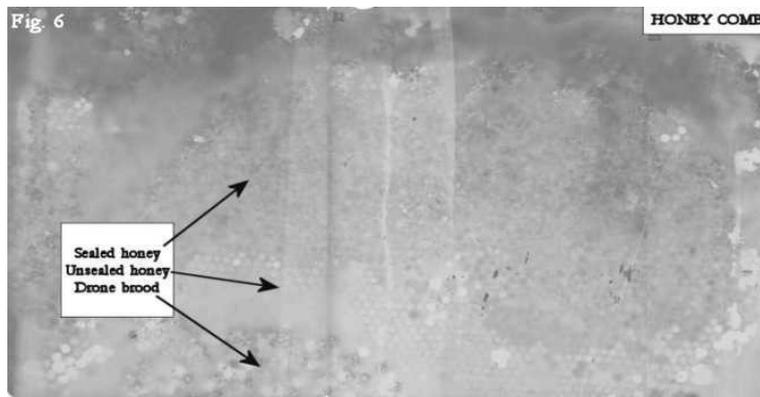


Fig. 6 - Autoradiographie d'un rayon de miel. Les points isolés, ayant une couleur plus foncée, sont des produits artificiels.

(à droite, en haut) RAYON DE MIEL

(à même l'image) Miel operculé

Miel désoperculé

Couvain de faux-bourdon

Les résidus du miel

Après le traitement de 1999, la teneur en acide oxalique du miel désoperculé, collecté dans les magasins, a augmenté jusqu'à la valeur moyenne de 0,59 mg/kg, valeur atteinte au 4ème jour. En commençant par le 8ème jour, la contamination a été en dessous de 0,1 mg/kg. Les échantillons prélevés

dans les réserves de miel pendant l'automne suivant continuaient d'avoir 0,07-0,1 mg/kg. Ces valeurs sont réduites, si on les compare avec la teneur naturelle d'acide oxalique du miel, qui se situe entre 3 et 760 mg/kg, en fonction du type de plantes botaniques (NANETTI *et al.*, 2002) et entrent dans la gamme naturelle de variabilité. Tout cela indique un risque réduit de contamination grave du miel destiné à l'extraction.

En 2002, le miel a été collecté dans les rayons bâtis par les abeilles dans la période entre deux prélèvements successifs d'échantillons, réduisant ainsi une possible influence due à la dilution avec du miel non contaminé déjà existant. Ce fait confère aux données relevantes un plus d'importance en ce qui concerne le transfert réel des abeilles au miel. En ce cas, un niveau maximal de 54,2 mg/kg a été enregistré à 12 heures après le traitement (Fig. 5), mais une baisse soudaine a suivi, menant à des valeurs qui varient entre 6 et 13,8 mg/kg, dans la période des premiers 1-12 jours après le traitement. Les valeurs enregistrées ultérieurement se sont situées au-dessous de 1 mg/kg.

Remerciements

Les auteurs tiennent à exprimer leur gratitude au Prof. Maria Adelaide Vecchi, de l'Université de Bologne et au Prof. Adriano Podestà, de l'Université de Pissa, pour les discussions fructueuses et leur suggestions valeureuses.

RÉFÉRENCES

- Bernardini M., Gardi T. (2001), Impatto degli interventi sanitari per il controllo dell'acaro varroa sulla qualità del miele e della cera. *Apitalia* 28(7-8): 21-24
- Bogdanov S., Charrière J.D., Imdorf A., Kilchenmann V., Fluri P. (2002), Determination of residues in honey after repeated field trials with formic and oxalic acid. *Apidologie* 33(4): 399-409
- Del Nozal M.J., Bernal J.L., Diego J.C., Gómez L.A., Ruiz J.M., Highes M. (2000), Determination of oxalate, sulphate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. of Chromatography* 881: 629-638
- Fluri P., Sabatini A.G., Vecchi M.A., Wille H. (1981), Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *J. Apic. Res.* 20(4): 221-225
- Mutinelli F., Baggio A., Capolongo F., Piro R., Biasion L. (1997), L'acido ossalico nella lotta alla varroasi. *L'ape nostra amica* (4): 4-7
- Nanetti A. (2002), Oxalic acid treatments for varroa control (review). Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002
- Nanetti A., Ghini S., Gattavecchia E., Bartolomei P., Marcazzan G.L., Massi S. (2002), Pharmacodynamics of oxalic acid and treatment residues in honey. Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002. Poster session
- Nanetti A., Stradi G. (1997), Oxalsäure-Zuckerlösung zur Varroabekämpfung. *Allg. Dtsch. Imkerztg* 31 (11): 9-11