



HAL
open science

La spectrométrie de masse comme outil d'investigation lors des mortalités massives aiguës d'abeilles

Valérie Bouchart, Margot Begue, Christelle Dubreule, Stéphane Le Glatin

► To cite this version:

Valérie Bouchart, Margot Begue, Christelle Dubreule, Stéphane Le Glatin. La spectrométrie de masse comme outil d'investigation lors des mortalités massives aiguës d'abeilles. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 2021. hal-03436403

HAL Id: hal-03436403

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-03436403>

Submitted on 19 Nov 2021

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.

La spectrométrie de masse comme outil d'investigation lors des mortalités massives aiguës d'abeilles

Valérie BOUCHART^{1,2}, Margot BEGUE¹, Christelle DUBREULE¹, Stéphane LE GLATIN¹

¹LABÉO, Saint Contest, France

²INSERM, UMR 1086 Anticipo, Université de Caen-Normandie, France

François Baclesse, Caen, France

Résumé :

Les activités analytiques de LABÉO autour de la santé des abeilles se sont enrichies d'une nouvelle stratégie permettant de déterminer rapidement l'implication de produits phytosanitaires dans les cas de mortalité massive aiguë d'abeilles. Pour cela, une analyse de dépistage par screening sur LC-Q-Tof est réalisée, suivie d'une confirmation et une quantification par analyse en LC-MS/MS. L'extraction des différents pesticides à partir des abeilles est effectuée selon la méthode normalisée « QuEChERS ». Cette stratégie analytique permet d'élargir à de nouvelles molécules la recherche de pesticides qui ciblent le plus souvent les insecticides pyréthrinoïdes ou néonicotinamides. Le cas d'une intoxication d'abeilles vient illustrer l'efficacité de cette approche analytique.

Mots-clés : Abeille, pesticides, intoxication, LC-Q-Tof, LC-MS/MS.

Abstract:

LABEO's analytical activities on bee health have been enriched by a new strategy allowing to quickly determine the involvement of phytosanitary products in cases of acute mass mortality of bees. For this purpose, a screening analysis on LC-Q-Tof was performed followed by a confirmation and a quantification by LC-MS/MS analysis. The extraction of the various pesticides from the bees was carried out according to the " QuEChERS " standardized method. This analytical strategy allows to widen to new molecules the search for pesticides which most often target pyrethroid or neonicotinamid insecticides. The case of a bee poisoning illustrates the efficiency of this analytical approach.

Keywords: Bee, pesticides, poisoning, LC-Q-Tof, LC-MS/MS

LABÉO, Pole d'analyses et de recherche de Normandie est un groupement d'intérêt public (GIP), est né de la fusion de 4 laboratoires départementaux (Calvados, Eure, Manche et Orne). Il intervient en tant que laboratoire de santé publique au travers des suivis sanitaires, épidémiologiques et de l'environnement. Une équipe pluridisciplinaire de 400 collaborateurs réalise chaque année environ 1 250 000 dosages et recherches pour 80 000 clients en France et à l'étranger dans les domaines de la santé animale, les analyses d'eau ou des produits alimentaires. LABÉO a développé une expertise nationale dans le domaine apicole pour le suivi des pathologies des abeilles. Membre du réseau d'épidémiosurveillance (Résabeille) le laboratoire dispose de plusieurs agréments pour des recherches quantitatives de virus, bactéries ou parasites. LABÉO intervient également pour les analyses des miels et collabore étroitement avec l'interprofession apicole pour répondre à leurs besoins.

INTRODUCTION

La mortalité des abeilles est un phénomène naturel dans les ruchers puisque chaque hiver 5 à 10 % des colonies décèdent. Cependant depuis le milieu des années 80, des cas de surmortalité des colonies d'abeilles sont observés au niveau mondial. Depuis 1998, le phénomène est appelé Syndrome d'Effondrement des colonies d'abeilles (en anglais : « *Colony Collapse Disorder* » : CCD). Il s'agit d'un phénomène complexe aux origines multiples : causes biologiques, exposition aux produits chimiques employés dans l'environnement, alimentation, pratiques apicoles... La diversité de ces causes, pouvant intervenir de manière isolée ou en association, est susceptible de participer à l'affaiblissement des colonies voire de provoquer une Mortalité Massive Aigüe d'Abeilles (MMAA). Une colonie d'abeille est considérée victime de MMAA lorsque, brutalement et sur une période inférieure à 15 jours, des abeilles adultes sont retrouvées mortes ou moribondes sous forme d'un tapis devant ou dans la ruche (volume d'abeilles touchées supérieur à un litre), et/ou lorsque la colonie est victime de dépopulation (hors essaimage), c'est à dire qu'il y a disparition d'une grande partie des abeilles adultes avec présence dans la ruche d'une population très réduite d'abeilles avec présence de couvain, de réserves de miel et de pollen en quantité [1].

En Normandie, les Directions Départementales de Protection des Populations (DDPP) centralisent les déclarations et observations des MMAA des apiculteurs et le vétérinaire doit alors orienter les investigations, s'il s'agit d'une suspicion de maladies classées dangers sanitaires de premières catégories comme : la loque américaine, la nosérose, le petit coléoptère de la ruche (*Aethina tumida*) et l'acarien parasite *Tropilaelaps clareae*, ou s'il s'agit d'une suspicion de MMAA liée à une intoxication par des agents chimiques comme les produits phytopharmaceutiques, les biocides ou les médicaments vétérinaires. Les cas de

dépérissement ou d'affaiblissement ne sont actuellement pas pris en compte dans ce dispositif, du fait de leur caractère non aigu. Parmi ces produits potentiellement toxiques, les recherches réalisées s'intéressent essentiellement aux pesticides comme les composés organophosphorés, les produits organochlorés, les pyréthriinoïdes et les néonicotinamides. Il est cependant intéressant de suivre d'autres familles d'insecticides ou d'autres types de molécules pesticides comme les herbicides, fongicides auxquelles les abeilles peuvent être potentiellement exposées dans leur environnement. Afin de répondre à ces besoins, l'objectif de cette étude est donc de déterminer rapidement, après la collecte des échantillons d'abeilles mortes, la présence de produits chimiques dans un spectre suffisamment large, d'aider les autorités à prendre les mesures sanitaires adaptées et de définir les suites à donner, en enquêtant sur l'origine de la contamination.

METHODOLOGIE

Afin d'être le plus exhaustif possible, une stratégie d'analyse a été développée et vise à dépister la présence éventuelle de pesticides par une analyse chromatographique non ciblée en Chromatographie Liquide couplée à un détecteur de masse à temps de vol (LC-Q-ToF : Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-flight) et une confirmation et quantification par une analyse ciblée en Chromatographie liquide avec spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS : Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry) pour une liste de 208 molécules potentiellement présents dans l'environnement. Dans ce cas, le recours à la chromatographie liquide oriente les recherches vers les molécules polaires. En parallèle, une démarche comparable est réalisée pour les molécules apolaires avec des analyses en GC/MS avec confirmation en GC/MS/MS afin d'élargir ces recherches à un spectre large d'agents chimiques.

L'objectif est de disposer d'une méthode permettant d'extraire et de quantifier une grande variété de résidus de pesticides et certains métabolites dans des matrices complexes telles que les abeilles, qui est une matrice riche en matière grasse et en pigment. Dans le cas de l'analyse de résidus de pesticides, la qualité et la maîtrise des phase d'extraction et de purification sont essentielles pour éviter les interférences et l'encrassement des chaînes analytiques.

a. Préparation des échantillons

Le protocole développé est basé sur la méthode normalisée « QuEChERS » soit **Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe**, (rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sécuritaire) [2]. Deux grammes d'abeilles, correspondant à environ 20 abeilles, sont placés dans un tube avec 10 ml d'acétonitrile de qualité « LC-MS » (JT Baker™, Radnor, USA), 3

ml d'eau ultra pure (Milli-Q®, Millipore, Molsheim, Allemagne) et 3 ml d'hexane de qualité « pestipur » (Carlo-Erba Reagents SAS, Val de Reuil, France) afin de réaliser une extraction liquide-liquide (Figure 1). L'ensemble est homogénéisé et extrait à l'ultra-turrax (IKA®-Werke, Staufen, Allemagne). Après centrifugation, le surnageant est transféré et agité vigoureusement dans des tubes contenant un mélange commercial (Agilent, Santa Clara, USA) de sulfate de magnésium (MgSO₄), de phases de silices greffées d'amines primaires et secondaires (PSA) et de phase de type C18 pour réaliser une purification par extraction en phase solide dispersive (dSPE). Après centrifugation, filtration et dilution les extraits sont analysés en LC-Q-Tof pour la phase de dépistage.

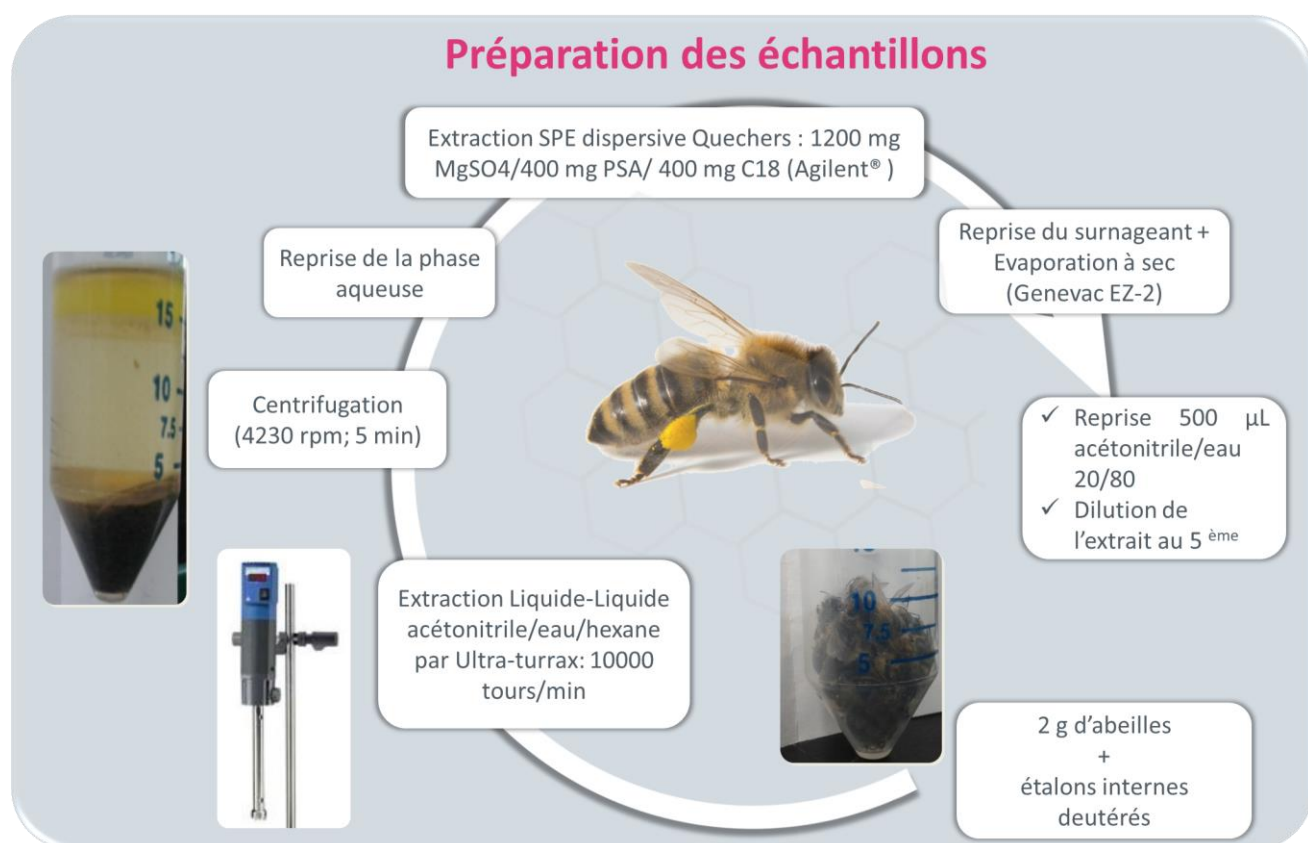


Figure 1 : Protocole de préparation des échantillons d'abeilles

b. Analyse de dépistage

L'analyse non ciblée consiste à réaliser un screening sur les extraits d'abeilles à l'aide d'un LC-Q-Tof Agilent (Santa Clara, USA) 6540 équipé d'une source Dual Jet Stream ElectroSpray ionisation (ESI). La méthode chromatographique utilisée nécessite une colonne Waters™ (Milford, USA) Acquity UPLC BEH C18, 1,7µm, 150 mm x 2,1 mm. La phase mobile est constituée d'un gradient d'eau ultrapure et acétonitrile acidifié à 0,01 % d'acide formique (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) avec un débit de 0,45 ml/min

pendant une durée de 25 minutes. 5 µl sont injectés et analysés selon les deux modes d'ionisation positif et négatif. Les chromatogrammes obtenus sont ensuite soumis à une recherche sur les bases de données contenant plus de 1600 références dont une base spécifique pesticides (Agilent).

Cette analyse avec un détecteur de masse haute résolution permet d'obtenir des pics chromatographiques correspondant à des molécules caractérisées avec leur spectre et leur masse moléculaires exacte. La recherche dans les bibliothèques disponibles compare la formule brute des composés et permet de suspecter la présence de molécules potentiellement toxiques. Si cette phase de dépistage montre la présence de composés chimiques connus, l'analyse se poursuit avec la méthode de quantification. Si la molécule suspectée n'est pas dans la méthode LC-MS/MS, on vérifiera son identification par l'injection d'un étalon de référence dans les mêmes conditions.

c. Analyse quantitative

L'analyse ciblée est une méthode développée par LABÉO pour rechercher 208 résidus de pesticides (herbicides, fongicides et insecticides) à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Agilent 1290 couplée à un spectromètre de masse en tandem Agilent 6470 équipée d'une source ESI, permettant de quantifier ces molécules en mode positif ou négatif et de confirmer les résultats de l'analyse de dépistage. L'intérêt d'utiliser la spectrométrie de masse est sa grande sensibilité et le nombre très important de composés détectés et quantifiés simultanément. Les extraits utilisés pour l'analyse de screening sont quantifiés par calibration interne avec une limite de quantification de 1 à 6 ng/abeille et des rendements d'extractions compris entre 60% et 120 % selon les molécules. Les conditions d'analyse utilisent la même colonne de chromatographie que précédemment avec un gradient de solvant constitué d'eau ultrapure et acétonitrile acidifiés à 0,01 % d'acide formique. La quantification est réalisée à l'aide de courbes de calibration en étalonnage interne pour chaque analyte (Tableau 1). Cette méthode a été validée selon la norme NF V03-110 [3] avec des études de la fonction d'étalonnage, l'étude de l'exactitude (répétabilité et reproductibilité) et la détermination des limites de quantification.

Molécules	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Energie de Fragmentation (eV)	Energie de collision (eV)	Mode +/-	Etalon interne attribué
acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4 D)	221	163	80	8	-	2,4D d3
	219	161	80	8	-	
Clothianidine	250	169	56	5	+	Atrazine d5
	250	132	56	9	+	
Metconazole	320	125	115	44	+	Atrazine d5
	320	70	115	24	+	
Métolachlore	284	252	95	8	+	Métolachlore d6
	284	176	95	24	+	

Tableau 1 : Exemple de pesticides recherchés avec les transitions et étalons internes associés

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE MMAA LIÉE À UNE INTOXICATION

Ce process analytique a été appliqué sur un échantillon en provenance d'un apiculteur déclarant une MMAA sur quatre ruches en juin 2017.

L'analyse de dépistage en LC-Q-Tof avec la recherche en base de données a mis en évidence la présence d'un pic chromatographique identifié comme étant du fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$, 437,15 g/mol) (Figure 2). Cette molécule est un insecticide appartenant à la famille des phénylpyrazoles [4]. C'est une substance active de produits phytosanitaires et d'antiparasitaires vétérinaires, qui présente des effets insecticide et acaricide.



Figure 2 : Pic chromatographique de l'échantillon avec identification du fipronil en mode négatif (A) et le spectre de masse associé (B)

L'analyse quantitative en LC-MS/MS qui a suivi, a permis de confirmer la présence de fipronil à une concentration de 0,092 µg/g d'abeilles soit 0,009 µg/abeille (Figure 3).

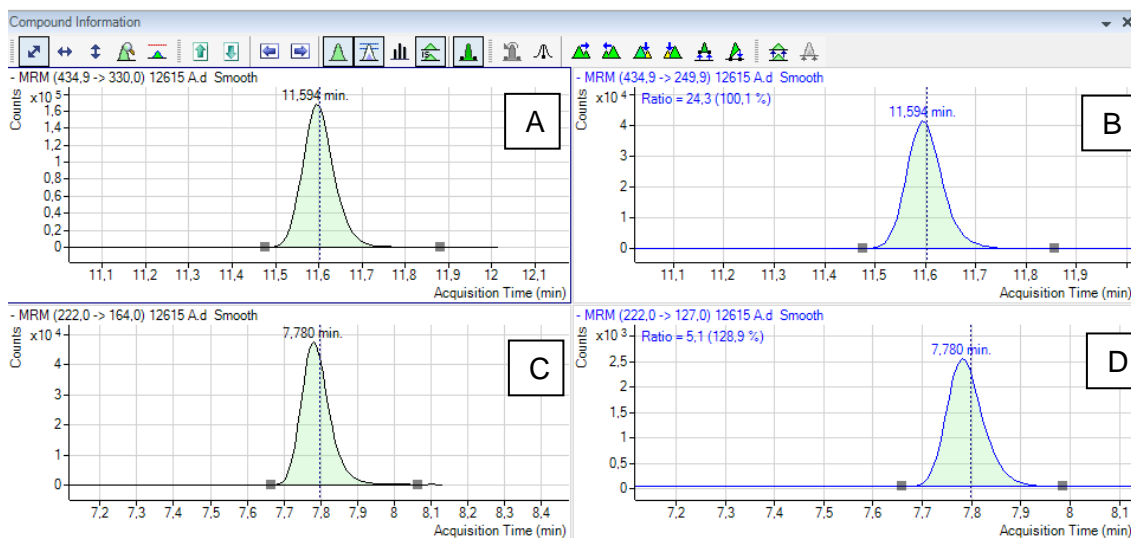


Figure 3 : Pics chromatographiques de l'échantillon en analyse LC-MS/MS en mode négatif avec les transitions de quantification 434,9>330 (A) et de qualification 434,9>249,9 (B) du fipronil et de son étalon interne associé (C, D) (2.4 D d3)

Les données de toxicité du fipronil sont DL50oral = 0,00417 µg /abeille et DL50contact (48h) = 0,00593 µg/abeille [5]. La concentration retrouvée sur les abeilles mortes correspond à environ deux fois les doses DL50 oral ou de contact. L'hypothèse que cette mortalité massive aigüe d'abeilles soit liée à une intoxication par le fipronil, a donc été émise. Des investigations ont été menées par les services vétérinaires pour déterminer la source et les circonstances de cette exposition.

DISCUSSION

Le cas présenté démontre l'intérêt d'une approche basée sur deux types de spectrométrie de masse comme outil de dépistage et de quantification lors des mortalités massives aigües d'abeilles. En 2016 et 2017, le dispositif national de surveillance des MMAA a recensé respectivement 147 déclarations provenant de 50 départements, et 195 provenant de 52 départements. Au total pour ces deux années, onze cas d'intoxications aigües avérées ont été mis en évidence. Des cas d'intoxications probables, des substances ainsi que des usages interdits ont également été identifiés à la suite des enquêtes menées [6]. Bien que non majoritaires, les MMAA liées à des intoxications chimiques doivent être identifiées afin d'améliorer les pratiques agricoles. Il est important de réaliser dès que possible les

prélèvements et le travail d'enquête afin de collecter les informations (type de cultures, traitements éventuels, environnement...), et pour éviter la dégradation des analytes.

L'abeille est une matrice complexe qui peut engendrer des interférences dans l'analyse LC-MS/MS notamment lors de la phase d'ionisation de l'échantillon dans la source. Il convient donc de contrôler ces interactions par l'utilisation d'étalons internes marqués et par une calibration avec une gamme d'étalonnage préparée dans des extraits d'abeille afin de tenir compte de l'effet matrice.

L'utilisation de LC-Q-Tof permet d'accéder à la recherche dans des bases de données, de molécules non ciblées dans les méthodes d'analyse habituelles et donc d'élargir le nombre de produits dépistés. La LC-Q-Tof peut également être utilisée pour la quantification mais cette configuration est souvent moins sensible que la LC-MS/MS.

Ce protocole a également été appliqué sur des échantillons d'abeilles saines afin de déterminer le niveau basal de la contamination de l'environnement. Ces analyses ont permis de mettre en évidence la présence sur les abeilles de plusieurs résidus de pesticides à des faibles doses. Ces produits peuvent avoir un effet d'intoxication chronique et il est important d'étudier leur impact sur la santé ou le comportement de l'abeille [7].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le process analytique proposé permet d'optimiser les recherches de produits toxiques en associant un protocole de préparation des échantillons rapide et facile à mettre en œuvre, une analyse de dépistage sur un large panel de molécules en LC-Q-Tof et une méthode de confirmation et la quantification très sensible en LC-MS/MS. Cette méthodologie pourra être élargie à d'autres matrices apicoles (miel, cire, couvain ...) pour collecter plus de données sur les intoxications aiguës ou chroniques et être utilisée dans d'autres contextes comme des suivis environnementaux.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Instruction technique DGAL/SASPP/2018-444 du 12/06/2018 - Surveillance des mortalités massives aiguës d'abeilles adultes avec hypothèse d'intoxication par des produits et pratiques phytopharmaceutiques, biocides et médicamenteuses.

[2] AFNOR, Norme Française, "Aliments d'origine végétale - Multi méthode de détermination des résidus de pesticides par analyse CG et CL après extraction/partition avec de l'acétonitrile et purification par SPE dispersive - méthode modulaire QuEChERS", NF EN 15662, Mai 2018, AFNOR.

- [3] AFNOR, Norme Française - Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude - NF V03-110 Mai 2010.
- [4] Base de données INRS fiches toxicologiques – Fipronil – Fiche toxicologique n°286. Edition **2012**.
- [5] ANSES - Phytopharmacovigilance - Synthèse des données de surveillance – Fipronil – Octobre **2018**.
- [6] Meziani F., Barthelet B., Oudard E., Lecieux L., Le Louarne Y., Orłowsky M., Roy C., Bronner A. - La surveillance officielle des mortalités massives aiguës et des dangers sanitaires de première catégorie des abeilles - Bilan 2015 et 2016 et perspectives d'évolution. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°81 – Numéro spécial abeilles (2) – Novembre **2017**.
- [7] Collet C., Charreton M. - Evaluation des capacités locomotrices de l'abeille en laboratoire : une méthode qui permet d'identifier des effets sublétaux après exposition à des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes. Innovations Agronomiques 53 (**2016**), 105-109.