



Note scientifique sur les effets secondaires de l'acide oxalique sur l'abeille ouvrière (*Apis mellifera*) : aspect biochimique (Scientific note on side effects of oxalic acid on the worker bee (*Apis mellifera*): biochemical aspect)

N. Adjlane^{1*}, N. Chahbar¹, A. Maldi¹, S. Doumandji², N. Haddad³

¹ Département de Biologie, Faculté des Sciences, université M'hamed Bougara de Boumerdès, Algérie

² Ecole Nationale supérieure agronomique El Harrach, Algérie

³ National Center for Agriculture Research and Extension, Bee Research Unit. P.O. Box 639- Baq'a 19381. Jordan

Received 22 Jan 2013, Revised 7 Feb 2013, Accepted 7 Feb 2013

* Corresponding author. E mail: adjlanenouredine@hotmail.com

Abstract

Oxalic acid is considered as widely used method for treatment against varroa destructor mite, this mite causes a considerable disorder to honeybees comparing with other bee diseases. Whereas the usage of Oxalic acid may causes a weakening of bee colonies as a side effect. This study aims to determine the effects of oxalic acid on the biochemical aspect of the honeybee *Apis mellifera*, by studying the variations in the content of different metabolites of the body and hemolymph (proteins, lipids and carbohydrates). Treatment with oxalic acid disrupts the metabolism of the bee, the results show that it causes a drop in carbohydrate and fat and increased protein levels in the body and the hemolymph. These findings may explain cases of weakness reported by beekeepers after application of this treatment.

Keywords: Oxalic acid, *Apis mellifera*, hemolymph, side effects, Biochemistry

Résumé

L'acide oxalique est un moyen de lutte alternative contre la varroase. Cette pathologie causée par l'acarien *Varroa destructor* est considérée comme l'une des pathologies les plus dangereuses de l'abeille domestique. L'acide oxalique constitue un des moyens de lutte efficace contre cette pathologie, mais il provoque un affaiblissement des colonies d'abeilles. Dans le but d'expliquer les causes de cet affaiblissement, nous proposons cette étude qui a pour objectif de déterminer les effets de l'acide oxalique sur l'aspect biochimique de l'abeille *Apis mellifera*, en étudiant les variations de la teneur en différents métabolites du corps et de l'hémolymphe (protéines, lipides et glucides). Le traitement à l'acide oxalique perturbe le métabolisme de l'abeille, les résultats obtenus montrent qu'il provoque une chute de la teneur en glucides et des lipides et une augmentation du taux de protéines dans le corps et l'hémolymphe. Ces résultats peuvent expliquer les cas d'affaiblissements enregistrés par les apiculteurs après l'application de ce traitement.

Mots clés : Acide oxalique, *Apis mellifera*, hémolymphe, effets secondaires, biochimie

Introduction

La varroase est une maladie parasitaire provoquée par l'acarien *Varroa destructor*. Elle constitue un grand déficit pour l'apiculture. En effet, c'est le premier agent responsable de l'affaiblissement voire la perte de colonies et du mauvais hivernage des abeilles [1, 2, 3, 4, 5]. Pour cela, le traitement de cette pathologie a fait sujet de plusieurs travaux de recherche. La varroase est traitée par des agents chimiques [3, 4, 5]; par des méthodes biologiques et aussi par des méthodes alternatives utilisant quelques huiles essentielles et acides organiques tels que l'acide formique, citrique, lactique, et oxalique [6, 7, 8, 9]. Des travaux ont montré que ce dernier a une grande efficacité en absence du couvain mais d'autre part, il provoque un affaiblissement des colonies d'abeilles [10, 11], un effet négatif sur le développement du couvain [12] et des répercussions pathologique sur les organes internes de l'abeille [13]. Nos connaissances sur l'acide actif sont loin d'être complètes, surtout l'action de l'acide sur l'aspect biochimique de l'abeille mellifère. La compréhension de ce phénomène est vitale en vue de l'entendement des effets négatifs du traitement et l'amélioration des méthodes d'application. L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de cet acide sur la quantité de lipides, de protéines et de sucres dans l'hémolymphe et dans le corps entier des abeilles ouvrières.

2. Matériels et méthodes

L'expérimentation s'est déroulée pendant les mois de février et de mars 2011 dans une région du centre d'Algérie (Blida : 36° 34' 59" N et 3° 0' 0" E) sur des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. La dose utilisée pour le traitement avec l'acide oxalique est de 35 g par litre de sucre distribuée par par dégouttement entre les cadres occupées par les abeilles. 20 colonies ont été traitées avec une quantité de 40 à 45 ml par ruche. Des abeilles ouvrières adultes d'*Apis mellifera intermissa* âgées de 7- 8 jours ont fait l'objet de nos tests. Les prélèvements des échantillons d'abeilles traitées ont été effectués après 24h (j+1) et 72h (j+3) du traitement à l'acide oxalique accompagnés d'un lot de témoins non traités (Tem) ayant le même âge.

L'extraction des différents métabolites (protéines, glucides et lipides) a été réalisée selon le procédé de Shibko et al [14] sur le corps entier et sur l'hémolymphe des abeilles ouvrières d'*Apis mellifera intermissa* des trois lots constitués : Tem (T0), j+1 (T1), et sur j+3 (T2). Les abeilles de chaque lot ont été débarrassées de leurs dards ; puis de leurs appareils digestifs, afin d'éviter tout biais relatif à l'alimentation [14] avant d'être placées chacune dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20% et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Le corps de chaque abeille est retiré du TCA 20% et broyé à l'azote liquide avec un mortier et un piston. Il est ensuite mis à nouveau dans le TCA, puis agité et conservé à -20°C.

Le prélèvement de l'hémolymphe a été réalisé par ponction (3µl par abeille) au niveau des membranes inter segmentaires des tergites 2 et 3 [15] grâce à des microcapillaires. L'hémolymphe est ensuite conservé dans 300 µl d'éthanol 95% à une température de -80°C. Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford [16], le dosage des glucides a été réalisé selon la méthode de Duchateau et Florquin [17] et celui des lipides ont été quantifiés selon la méthode de Goldsworthy et al [18].

Les données obtenues sont analysées avec le logiciel Statistica version 5.0 suivant le processus d'analyse de variance (Anova). La comparaison des moyennes a été faite par le test de Newman – Keuls au seuil de 5 %.

3. Résultats et discussion

Le taux de glucides a diminué 24 heures après le traitement dans le corps entier comme dans l'hémolymphe, cette diminution est estimée à 1400 µg/ml dans le corps entier et de 450 µg/ml dans l'hémolymphe. Une différence significative a été observée entre le lot témoin et le lot traité. Ces glucides reprennent leur taux normal avant 3 jours de traitement. Quant aux protéines, leur teneur avait connue une augmentation 24 heures après le traitement. Ils ne reprennent leur taux normal à 72 heures du traitement dans le corps entier et l'hémolymphe, d'où une différence non significative enregistrée entre les deux lots témoin et traitées après 72 heures. On note une diminution significative 24 heures après le traitement du taux de lipides dans le corps entier et dans l'hémolymphe, Cette quantité augmente à nouveau à 72 heures dans l'hémolymphe des abeilles. Par contre dans le corps entier, la quantité des lipides diminue davantage à 72 heures après le traitement. Une différence significative entre le lot témoin et le lot traité a été notée respectivement dans l'hémolymphe et dans le corps entier (Fig. 1 et 2)

L'acide oxalique appliqué a provoqué une augmentation de la teneur des protéines dans l'hémolymphe et le corps entier après 24 heures du traitement. Un simple stress sur l'abeille provoque des modifications du profil protéique [20]. Aussi, une surexpression des protéines de choc thermique (Hsp 70 et Hsp 90), une augmentation du niveau de la mort cellulaire dans les glandes salivaires et une importante quantité de protéines dénaturées sont les effets remarquables suite à un traitement à l'acide oxalique chez les ouvrières [21]. Ces résultats sont similaires chez les larves de 4 jours exposées à une solution d'acide oxalique où le niveau de mort cellulaire due à la nécrose a augmenté de 10% avec une granulation intense du cytoplasme des cellules columnaires liée à une surexpression de la Hsp70 [13].

Les résultats de Nozal et al [22] rapportent que l'acide oxalique traverse la cuticule et qu'il pourrait contribuer à l'effet toxique. Selon ces derniers, l'administration topique de l'acide oxalique aboutit à la présence de ce dernier avec des concentrations variables dans les organes internes des abeilles (l'hémolymphe, le rectum, les tubes de Malpighi et le tube digestif). Martin-Hernandez et al [23] ont montré que l'application de l'acide oxalique par voie topique a provoqué des lésions des organes de l'appareil digestif après 24 heures et des dommages cellulaires accrus ont été remarqué après 72 heures du traitement. Les mêmes auteurs rapportent qu'une partie de l'acide oxalique est ingérée par l'abeille. Chaque activité métabolique dans l'organisme fait intervenir des enzymes. La capacité de l'abeille à métaboliser l'acide oxalique peut expliquer l'augmentation du taux de protéines dans l'hémolymphe. Ces dernières peuvent être soit des éléments immunitaires ou des enzymes secrétées pour la métabolisation de l'acide oxalique qui traverse la cuticule de l'insecte. Selon plusieurs travaux de recherche, les insecticides peuvent avoir un effet sur la réponse immunitaire des insectes. Cette dernière peut être élevée ou faible selon le type de produit chimique utilisé [20].

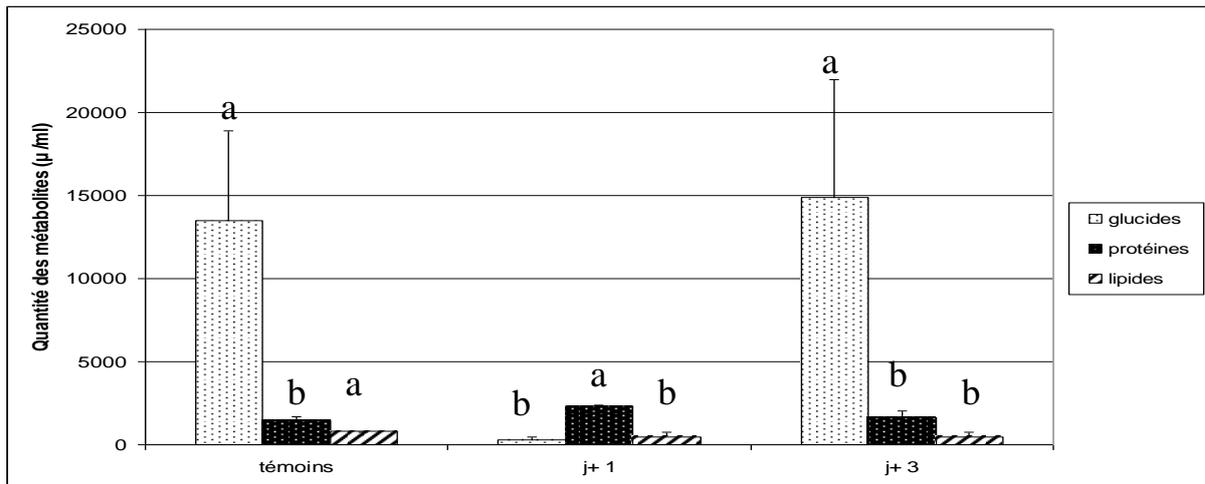


Figure 1. Quantités des métabolites dans le corps entier chez les trois lots d'abeilles (Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les trois lots d'abeilles ($<0,05$, test de Newman –Keuls au seuil de 5 %).)

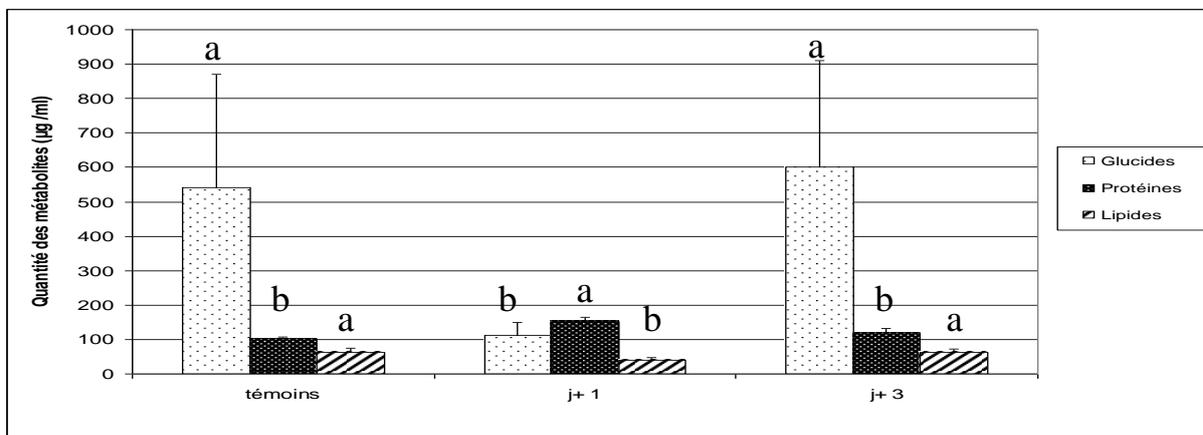


Figure 2. Quantités des métabolites dans l'hémolymphe chez les trois lots d'abeilles (Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les trois lots d'abeilles ($<0,05$, test de Newman –Keuls au seuil de 5 %).)

Nos résultats montrent une chute dans la teneur en glucides de l'hémolymphe et du corps après 24 heures du traitement. L'acide oxalique sur l'abeille est un stress qui conduit à diminuer le taux de sucre dans l'hémolymphe des abeilles. L'abeille les utilise comme source de carbone assurant ses besoins en énergie. En effet, c'est la principale source de production de la chaleur et la cire, en plus de ses besoins corporels. Mayack et Naug [24] indiquent que les infections parasitaires conduisent à la diminution du taux de sucre dans l'hémolymphe des abeilles butineuses.

On suppose que la grande quantité inhabituelle de protéines que l'abeille synthétise suite à son exposition à un traitement à l'acide oxalique nécessite un apport énergétique de la part de l'abeille que son alimentation et la teneur de son hémolymphe en glucides ne peut fournir. Pour cela, l'abeille mobilise ses réserves tissulaires en glucides, ce qui explique la diminution de leur taux dans son corps et son hémolymphe. Pour les lipides, nos résultats ont mis en évidence une diminution significative de leurs quantités. Qu'elles soient lymphatiques ou corporelles chutent après le traitement avec l'acide oxalique. Selon Bounias et Dujin [25] Une diminution du taux de lipides, notamment dans l'intestin, peut être induite par l'amitraz. Les abeilles ont des besoins en acides gras, en stérols et en phospholipides comme sources d'énergie, pour la synthèse de réserves corporelles ainsi que pour la biosynthèse de différents composés cellulaires dont les membranes cellulaires [26]. Toomemaa et al [7] rapportent la toxicité de l'acide oxalique mélangé avec du sirop de sucre est plus élevée que le traitement de l'acide oxalique mélangé avec de l'eau. Il est possible que le sucre en solution contenant des cristaux d'acide oxalique coincé à la cuticule et stigmates des abeilles qui prolongent l'effet toxique. Le produit appliqué sur le thorax de l'abeille traverse la cuticule à partir des canalicules cireux [27] et la distribution s'effectue directement dans l'organisme, plus particulièrement dans les zones les plus lipophiles. L'hémolymphe véhicule la molécule dans tout le corps de l'insecte [28]. C'est le cas de cet essai, où l'acide oxalique mélangé avec du sirop de sucre est appliqué directement sur les abeilles entre les cadres.

Le métabolisme de l'abeille est affecté négativement par le traitement à l'acide oxalique dans un intervalle de temps très réduit. Après 3 jours de traitement, les abeilles sont capables de reprendre leur état normal. Nanetti [11] a démontré la présence de l'acide oxalique dans l'hémolymphe des abeilles mellifères après le traitement. La plus haute valeur (10 ng/mg) a été enregistrée 12 heures après le traitement, mais une chute considérable a surgi par la suite, menant à une concentration de 1,1 ng/mg à la 84ème heure. En plus des effets de l'acide oxalique signalés dans cette étude, le traitement provoque aussi des mortalités des larves entre 5 et 13 % [29], un effet négatif sur le développement du couvain [12] et des pertes de reines [30]. Scheinder et al [31] soulignent aussi que l'acide oxalique provoque une diminution significative de l'activité et de la longévité des ouvrières. Ce qui affecte l'état général de la colonie d'abeille. D'ailleurs, un affaiblissement normal des colonies pendant l'hiver a été décrit, par rapport aux témoins [32,33,34].

Conclusion

Les résultats obtenus expliquent probablement l'affaiblissement des colonies d'abeilles observées après traitement à l'acide oxalique chez des apiculteurs algériens. Les variations des métabolites peuvent compromettre les possibilités d'une croissance normale de la colonie et peuvent avoir également des conséquences sur son développement. Pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la manifestation des effets enregistrés ainsi que pour la confirmation de ces hypothèses, il est souhaitable de réaliser des études de laboratoire avec l'application de différentes doses d'acide oxalique par ingestion et par voie topique.

Références

1. Haddad N., Evans J., Pettis J., Migdali, H. *Advances in Environmental Biology*, 1(1) (2007) 1.
2. Burgett M., Randal R., Walter T. *Am. Bee. J.* 149 (2009) 573.
3. Genersch E., Von Der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Buchler R. *Apidologie*, 41 (2010) 332.
4. Guezman-Novoa E, Eccles L., Calvete Y., McGowan J., Kelly P.G., Correa A. *Apidologie*, 41 (2010) 443.
5. Le Conte Y., Ellis M., Ritter W. *Apidologie*, 41(2010) 353.
6. Bacandritsos N., Papanastasiou I., Saitanis C., Nanetti A., Roinioti E. *Veter. Parasit.* 148 (2007) 174.
7. Toomemaa K., Martin A.J., Williams I.H. *Apidologie*, 41 (2010) 643.
8. Giovenazzo P., Dubreui P. *Exp Appl Acarol.* 33(2009) 123.
9. Mert, G., Yucel B. *Journal of animal and veterinary advances*, 10 (2011) 1106.
10. Charrirere J.D., Imdorf A. *Santé de l'Abeille*, 174 (1999) 335.
11. Nanetti A., Büchler R., Charrière J.D., Fries I., Helland S., Imdorf A., Korpela S., Kristiansen P. *Apiacta*, 38 (2003) 81.
12. Higes M., Meana, A., Suarez, J., Lorente, J. *Apidologie*, 30 (1999) 289.
13. Gregorc A., Nik A-P., Bowen I.D. *Apidologie*, 35 (2004) 453.
14. Shibko S., Koivistoinen, P., Tratyneck, C., Newhall A., Freidman L. *Analyt. Biochem.* 19 (1966) 415.
15. Hrassnigg A., Crailsheim K. *Apidologie*, 36 (2005) 255.
16. Chan Q.W.T., Howes C.G., Foster L.J. *Quantitative Mol. Cell. Proteomics*, 5 (2006) 2252.
17. Bradford M.M. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
18. Duchateau G.H., Florkin M. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.* 67 (1959) 306.
19. Goldsworthy G.I., Mordue W., Guthkelch J. *Gen. Comp. Endocrinol.* 18 (1972) 545.
20. Dandeu J.P., Lux M., Collin M.E., Rabillon J., David B. *Apidologie*, 22 (1991) 37.
21. Silva-Zacrin E., Gregorc A., Silva De Morales R. *Apidologie*, 37 (2006) 507.
22. Nozal M.J., Bernal J.L., Gomez L.A., Higes M., Aranzazu S.M. *Apidologie*, 34 (2003) 181.
23. Martin-Hernandez R., Higes M., Perez J. Nozal M.J. Gomez L., Meana A. *Spanish J. Agr. Res.* 5 (2007) 474.
24. Mayack C., Naug D. *Journal of Insect Physiology*, 56 (2010) 1572.
25. Bounias M., Dujin N., Popescovic S. *Pestic Biochem physiol.* 24 (1985) 149.
26. Hebert E W Jr. Honey bee nutrition, In: Graham, J.M. (ed) Dadant & Sons, (1992).
27. Noble-Nesbitt J. *Pestic. Sci.* 1 (1970) 204.
28. Burt P.E., Lord K.A., Forrest J.M., Goodchild R.E. *Entomol. Exp. Appl.* 14 (1971) 255.
29. Hatjina F., Haristos L. *Journal of Apicultural Research*, 44 (2004) 172.
30. Wagnitz J., Ellis M.D. *Science of Bee Culture*, 2 (2010) 8.
31. Schneider S., Eisenhardt D., Rademacher E. 2011 *Apidologie*, 42 (2011) 34.
32. Büchler R. *Allg. Dtsch. Imkerztg.* 10 (1999) 5.
33. Büchler R. *Allg. Dtsch. Imkerztg.* 11 (2000) 6.
34. Nanetti A., Büchler R., Charrière J.D., Fries I., Helland S., Imdorf A., Korpela S., Kristiansen P. *Apiacta*, 38 (2003) 81.