



## Interaction toxicopathologique entre les microsporidies *Nosema* et l'imidaclopride chez l'abeille (*Apis mellifera*)

ALAUX C.<sup>1</sup>, BRUNET J.-L.<sup>2</sup>, DUSSAUBAT C.<sup>1</sup>, MONDET F.<sup>2</sup>, TCHAMITCHAN S.<sup>2</sup>, COUSIN M.<sup>2</sup>, BRILLARD J.<sup>3</sup>, BALDY A.<sup>1</sup>, BELZUNCES L.P.<sup>2</sup>, LE CONTE Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 406 Abeilles et environnement, Laboratoire biologie et protection de l'abeille, site Agroparc, 84914 AVIGNON, France

<sup>2</sup> INRA, UMR 406 Abeilles et environnement, Laboratoire de toxicologie environnementale, site Agroparc, 84914 AVIGNON, France

<sup>3</sup> INRA, UMR 408 Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, site Agroparc, 84914 AVIGNON, France

Cet article est une version modifiée de : « Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). Alaux C., Brunet J.-L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L.P., Le Conte Y. Environmental Microbiology, sous presse, Copyright © [2010], copyright owner as specified in the journal. »

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/123226660/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

**L**es mortalités d'abeilles peuvent être attribuées à plusieurs causes : agents pathogènes, parasites, agents chimiques... Jusqu'à présent, la plupart des travaux réalisés pour expliquer ces disparitions se sont attachés à l'étude de ces facteurs pris séparément, sans qu'un seul puisse être clairement incriminé. Les auteurs des travaux qui sont présentés ici ont étudié l'interaction d'un agent pathogène, le *Nosema*, et d'un insecticide, l'imidaclopride sur la santé des abeilles. Ils mettent en évidence que cette interaction, à des concentrations rencontrées naturellement par les abeilles, induit un taux de mortalité et un stress énergétique significativement plus élevés que chaque agent seul. Si l'immunité individuelle ne semble pas affectée aux concentrations testées, l'interaction pathogène/pesticide provoque des effets immédiats sur la mortalité des abeilles et aussi, à long terme, avec une susceptibilité accrue de la ruche aux pathogènes.

### Introduction

Les abeilles jouent un rôle essentiel dans la pollinisation des plantes cultivées et la conservation de la biodiversité des écosystèmes naturels. Parmi celles-ci, l'abeille domestique (*Apis mellifera*) en est un acteur majeur. Malheureusement, depuis quelques années, les écosystèmes et

paysages agricoles sont confrontés à des mortalités massives des populations d'abeilles domestiques sans que les causes en soient déterminées. Différents facteurs de stress ont été pointés du doigt (pathogènes et pesticides), mais sans vraiment pouvoir en inculper un précisément. Une

bonne illustration de ce phénomène a été apportée par une récente étude épidémiologique qui n'a pas permis d'incriminer un seul des 61 facteurs mesurés (incluant la physiologie de l'abeille, des pesticides et pathogènes), favorisant ainsi l'hypothèse d'un syndrome multifactoriel avec

des interactions entre pathogènes et pesticides (Engelsdorp *et al.*, 2009). Un large éventail d'insecticides est utilisé en agriculture pour contrôler les populations d'insectes ravageurs des plantes. Cependant, à cause de leurs effets toxiques touchant aussi l'homme et les insectes non-ravageurs, des méthodes alternatives, plus écologiques, ont été développées. Ces méthodes de contrôle biologique font appel aux virus, bactéries et champignons pathogènes. L'intégration des méthodes de contrôle chimique et biologique a permis la création d'une « lutte intégrée ». Les agents biologiques les plus utilisés sont les champignons pathogènes (environ 750 espèces sont des pathogènes des insectes). Ces champignons pathogènes utilisés avec des insecticides interagissent de manière synergique et augmentent significativement la mortalité des insectes ravageurs. Parmi ces insecticides, l'imidaclopride (néonicotinoïde) est l'un des plus

efficaces à interagir avec les champignons pathogènes. Ces deux agents sont ainsi largement employés pour lutter contre les populations de termites, de fourmis coupeuses de feuilles et de thrips.

Le cas de l'imidaclopride (principe actif du Gaucho®) est particulièrement intéressant puisque cet insecticide systémique est largement utilisé sur les cultures à travers le monde et a été présenté comme étant la cause des pertes de colonies d'abeilles dans les années 1990. Cependant, malgré un fort pourcentage de ruche contaminées par l'imidaclopride et ses métabolites (Chauzat *et al.*, 2009), le niveau d'exposition est considéré comme subléthal avec très peu d'effets directs sur la mortalité des abeilles (Schmuck *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2009). D'un autre côté, la microsporidie parasitique, *Nosema ceranae*, qui fait partie de l'ordre des champignons, a été associée aux pertes de colonies mais pas de manière significative, à l'exception de travaux réalisés en

Espagne (Higes *et al.*, 2008). Face à cette absence d'effet significatif de facteurs isolés, nous avons posé la question suivante : Les abeilles sont-elles victimes d'une interaction entre un organisme infectieux (*Nosema*) et un agent chimique propagé par l'homme (imidaclopride) ? En d'autres termes, l'abeille est-elle affaiblie par le même type d'interaction utilisée en lutte intégrée contre les insectes nuisibles ?

Grâce à une collaboration étroite entre l'équipe « Biologie et protection de l'abeille » et l'équipe « Toxicologie environnementale » du Pôle Abeilles de l'INRA d'Avignon, les effets interactifs entre *Nosema* et l'imidaclopride ont été testés sur la santé des abeilles à la fois au niveau individuel et social. Plus spécifiquement, cette étude a été développée afin de déterminer les possibles effets sur : 1) la mortalité, 2) le stress énergétique, 3) l'immunité individuelle et 4) l'immunité sociale.

## Protocole expérimental

L'expérience a été réalisée sur des abeilles locales hybrides (*Apis mellifera mellifera*/*Apis mellifera ligustica*). Des ouvrières

âgées d'un jour ont été divisées en quatre groupes : groupe contrôle (pas de traitement), groupe infecté par le

*Nosema*, groupe exposé à l'imidaclopride, et enfin groupe à la fois infecté par le *Nosema* et exposé à l'imidaclopride.

### Infection au *Nosema*

Les microsporidies de *Nosema* ont été isolées à partir de ruches infectées. Des analyses génétiques ont permis de déterminer que *Nosema ceranae* et *Nosema apis* étaient toutes deux présentes. Afin de contrôler le niveau d'infection, les abeilles ont été nourries individuellement avec une dose

de 200 000 spores (cf. figure 1). Des doses similaires sont connues comme étant infectieuses chez les ouvrières.

**Figure 1.** Infection expérimentale d'une ouvrière avec une solution sucrée contenant 200 000 spores de *Nosema* par  $\mu$ l.

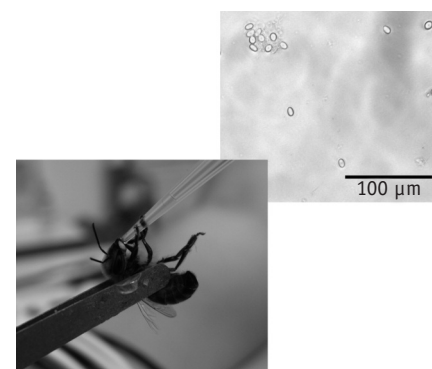


Photo Claudia Dussaubat (INRA)

### Exposition à l'imidaclopride

L'imidaclopride est présent à des concentrations atteignant 5  $\mu$ g/kg dans le pollen et le miel (Bogdanov, 2006), ce qui représente une concentration d'environ 7  $\mu$ g/kg dans la solution d'eau sucrée utilisée pour nourrir les abeilles. Des études préliminaires ont permis de démontrer que cette concentration est subléthale en

intoxication aiguë. Une faible, moyenne et forte concentrations correspondant à 0,7, 7 et 70  $\mu$ g/kg d'imidaclopride ont donc été utilisées pour les tests de mortalité et stress énergétiques (consommation de sucre). Les effets sur l'immunité ont été déterminés uniquement avec la concentration moyenne ren-

contrée dans l'environnement (7  $\mu$ g/kg). Les abeilles ont été exposées de manière chronique à l'imidaclopride en les nourrissant 10 heures par jour avec une solution sucrée contenant le pesticide. La mortalité et la consommation quotidienne de sucre par abeille ont été déterminées chaque jour. ➤

## ► Paramètres de l'immunité

Le taux d'hémocyte et l'activité enzymatique de la phénoloxylase (PO) ont été mesurés chez les abeilles âgées de 5 et 10 jours en tant que paramètre de l'immunité individuelle. Le taux d'hémocyte donne une mesure indirecte de l'immunocompétence cellulaire, impliquée dans les processus de phagocytose et d'encapsulation des parasites. La PO joue un rôle central dans

la réaction immunitaire des invertébrés en catalysant la mélanisation et donc l'encapsulation de corps étrangers.

Enfin, l'activité enzymatique de la glucose oxydase (GOX) a été analysée en tant que paramètre de l'immunité sociale. Cette enzyme, synthétisée dans les glandes hypopharyngiennes, catalyse l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en acide D-gluconique

et peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). Ce dernier, grâce à ses propriétés antiseptiques, permet la stérilisation de la nourriture larvaire et du miel et donc la prévention de maladies infectieuses (Sano *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 1963). Seules les abeilles âgées de 10 jours ont été analysées puisque c'est vers cet âge que le développement des glandes hypopharyngiennes est maximal.

## Résultats

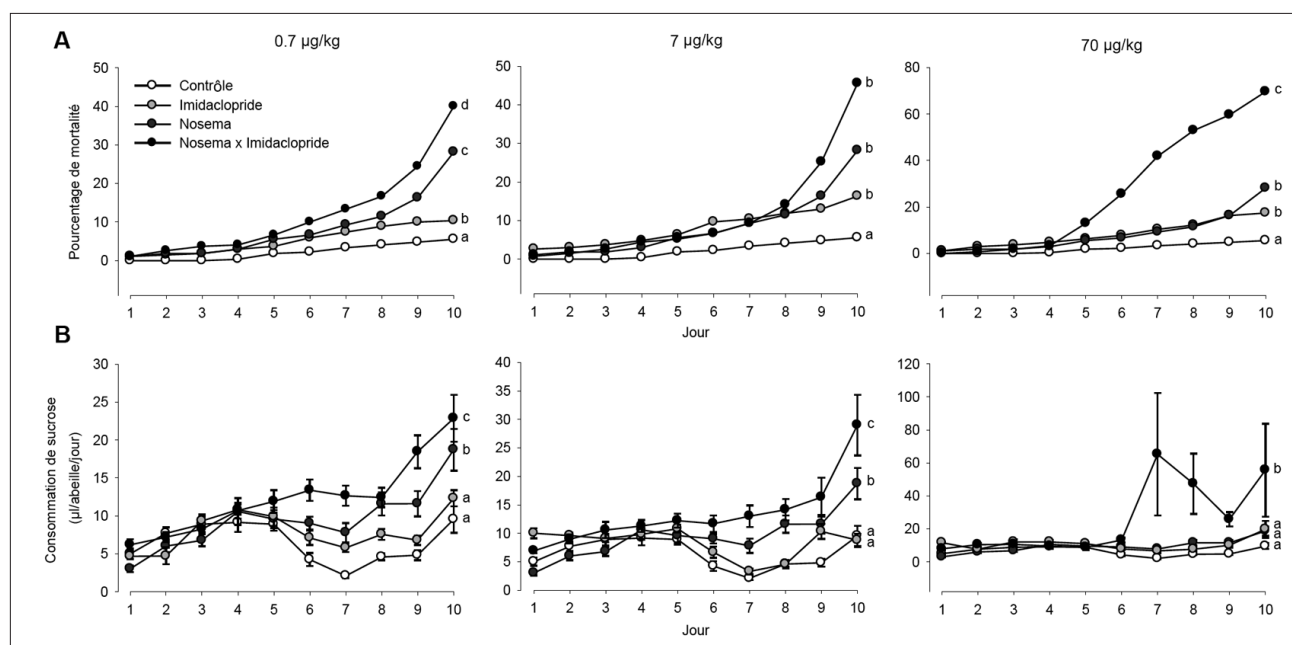
### Mortalité et stress énergétique

Dans chaque groupe expérimental, une augmentation de la mortalité au cours du temps a été observée, cependant elle est restée négligeable dans le groupe contrôle (environ 5 %) (modèle linéaire généralisé :  $P < 0,001$  pour chaque concentration d'imidaclopride ; cf. figure 2A). De plus, les différents traitements (*Nosema*, imidaclopride, *Nosema* x imidaclopride) ont eu un effet significatif sur la mortalité des abeilles ( $P < 0,001$  pour chaque concentration d'imidaclopride). Il est intéressant de noter qu'aucune différence

n'a été observée entre les abeilles infectées avec *Nosema* et les abeilles exposées à l'imidaclopride (excepté pour la plus faible concentration). En revanche, la mortalité a augmenté de manière très significative lorsque les abeilles étaient à la fois infectées avec *Nosema* et exposées à l'imidaclopride (cf. figure 2A). C'est assez remarquable pour la concentration la plus élevée où *Nosema* et l'imidaclopride ont « potentialisé » leurs effets.

Des profils très similaires ont été observés au niveau de la consommation

de sucre avec une augmentation au cours du temps (ANOVA sur mesures répétées,  $P < 0,001$  pour chaque concentration d'imidaclopride ; cf. figure 2B) et un effet significatif des traitements ( $P < 0,001$  pour chaque concentration d'imidaclopride ; cf. figure 2B). Cependant, les abeilles infectées avec *Nosema* ont généralement consommé plus de solution sucrée que les abeilles exposées à l'imidaclopride. Ce stress énergétique est devenu maximal lorsque les deux traitements ont été combinés.



**Figure 2.** Effet d'une infection avec *Nosema* et/ou d'une exposition à l'imidaclopride sur la mortalité et le stress énergétique des abeilles.

A) Effet sur la mortalité (exprimée en pourcentage cumulé du nombre d'abeilles mortes par cagette et par jour).

B) Effet sur le stress énergétique (exprimé en  $\mu$ l de solution sucrée consommée par jour et par abeille pendant les 10 heures de traitements à l'imidaclopride). Pour chaque traitement, trois colonies ont été analysées avec trois répliques (cagette) par colonie ( $N = 30$  abeilles par cagette).

Chaque lettre indique une différence significative entre les différents traitements (test post-hoc de Bonferroni,  $P < 0,05$ ).

## Immunité individuelle

Ni le taux d'hémocyte, ni l'activité enzymatique de la PO n'ont été affectés par les différents traitements (taux d'hémocyte :  $F_{3,349} = 1,3$ ,  $P = 0,274$  ; PO :  $F_{3,352} = 1,57$ ,  $P =$

$0,197$  ; cf. figure 3A et B). Cependant, une augmentation avec l'âge de l'activité de la PO a été mise en évidence ( $F_{1,352} = 10,9$ ,  $P < 0,001$ ). Le phénomène inverse a été observé

pour le taux d'hémocyte ( $F_{1,349} = 5,4$ ,  $P < 0,021$ ). Ces modifications avec l'âge correspondent à des processus physiologiques normaux (Schmid *et al.*, 2008).

## Immunité sociale

Au bout de 10 jours, un effet significatif des traitements sur l'activité de la GOX a été détecté ( $F_{3,182} =$

$7,3$ ,  $P < 0,001$  ; cf. figure 4). Alors que *Nosema* et l'imidaclopride seul n'ont eu aucun effet, leur combinai-

son a provoqué une réduction significative de la production de GOX par les glandes hypopharyngiennes.

## Discussion

En se focalisant sur les effets des pesticides ou pathogènes seuls, leurs effets synergiques ont longtemps été ignorés chez l'abeille. Cette synergie entre agents pathogènes et doses sublétales de pesticides est pourtant bien établie en lutte intégrée contre les insectes ravageurs. Ainsi, grâce à ce travail nous avons démontré que les abeilles infectées naturellement avec *Nosema* pouvaient être nettement affaiblies par une exposition à l'imidaclopride.

La combinaison des deux agents a induit le plus fort taux de mortalité chez les abeilles. L'évolution similaire de la consommation de sucre suggère une corrélation entre la mortalité et le stress énergétique. Cette corrélation permet d'apporter quelques éléments de réponse sur la nature des mécanismes de l'interaction entre *Nosema* et l'imidaclopride. Les microsporidies sont généralement dépourvues de mitochondrie et donc incapable de produire directement de l'ATP via la voie de la phosphorylation oxydative (Keeling et Fast, 2002; Cornman *et al.*, 2009). Elles sont ainsi fortement dépendantes de l'ATP de leur hôte, notamment pour leur germination très coûteuse en énergie. Cependant, grâce à la glycolyse, les microsporidies sont capables de produire de l'ATP en assimilant le glucose de l'hôte (Keeling et Fast, 2002). Cette dépendance des ressources énergétiques de l'hôte peut expliquer l'augmentation de la consommation de sucre chez les abeilles infectées avec *Nosema*. L'imidaclopride par contre n'a pas

modifié la demande énergétique des abeilles, ce qui suggère que les abeilles n'ont pas d'appétence particulière pour ce pesticide. Cependant, lorsque la nourriture (solution sucrée) était contaminée avec l'imidaclopride, l'augmentation de la prise alimentaire chez les abeilles parasitées s'est accompagnée d'une plus grande exposition à l'imidaclopride. Ainsi, bien que l'imidaclopride se trouve à des concentrations sublétales dans les ruches, une infection au *Nosema* peut exposer les abeilles à des doses létales en augmentant la consommation de nourriture contaminée aux pesticides. Ceci devient particulièrement flagrant avec les fortes concentrations en imidaclopride, où *Nosema* et l'imidaclopride potentialisent irrémédiablement leurs effets.

Au delà de leur impact direct sur la mortalité de l'hôte, les organismes parasites peuvent induire des coûts importants au niveau de l'immunité.

Par exemple, une stratégie adoptée par le parasite, pour optimiser sa survie et sa réplication, est de supprimer l'activité du système immunitaire de l'hôte, notamment réduire l'activité de la PO et la population d'hémocytes. Cependant, nos résultats ont montré que ni l'activité de la PO, ni le taux d'hémocytes n'ont été affectés par une infection au *Nosema*. Antunez et ses collègues (2009) ont montré que *Nosema apis* induit une augmentation de l'expression du gène codant pour la PO, mais au niveau enzymatique nous n'avons pas détecté de changement dans l'activité. Cette absence de réponse du système immunitaire peut s'expliquer par une déficience des mécanismes d'activation immunitaires et/ou un manque de stimulation par les microsporidies. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres paramètres de l'immunité (comme les peptides antimicrobiens) soient activés ou inhibés (Antunez *et al.*, 2009).

Les insectes sociaux, en particulier l'abeille, possèdent d'autres moyens de défense face aux pathogènes, comme l'immunité sociale, qui consiste en une coopération entre les membres de la société pour prévenir toute développement de maladies infectieuses. L'abeille domestique



Photo Yves Le Conte

**Photo 1.**  
Mortalité d'abeilles  
à l'entrée  
de la ruche.

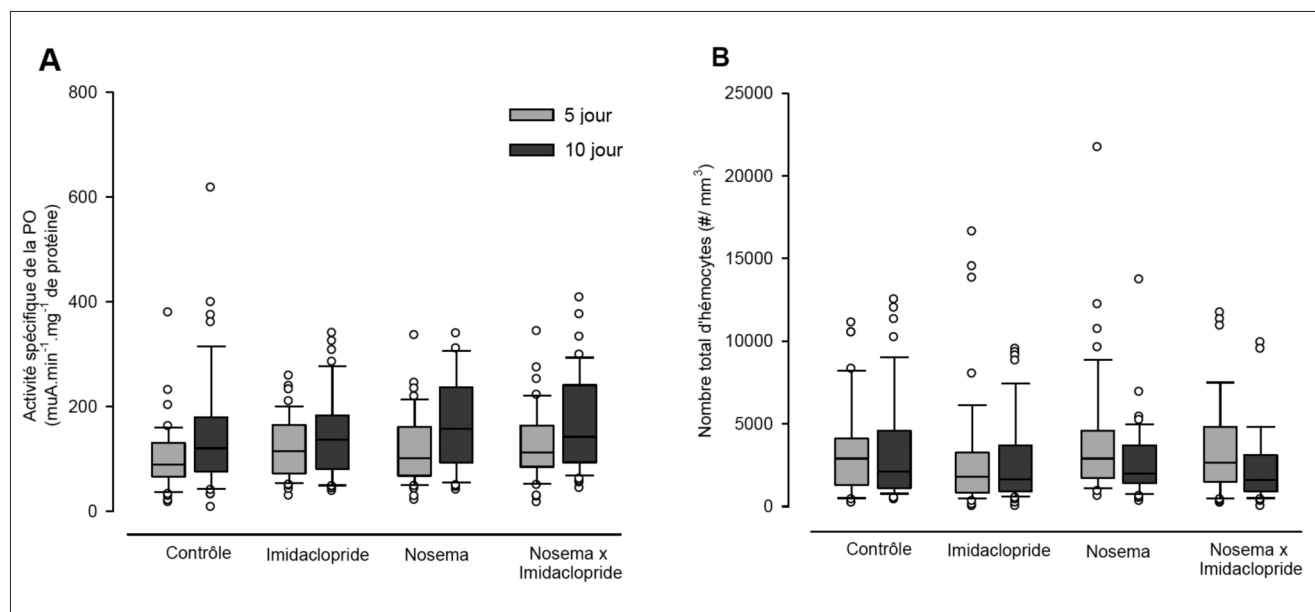


➤ ne possède qu'un tiers des gènes de l'immunité identifiés chez les insectes solitaires (Evans *et al.*, 2006). Ce manque apparent de gènes de l'immunité peut s'expliquer par une immunité sociale plus efficace et moins coûteuse que l'immunité individuelle. En effet, les défenses collectives sont très bien développées chez l'abeille avec notamment des comportements hygiéniques consistant à détecter et éliminer de la ruche le couvain malade (Wilson-Rich *et al.*, 2009). La production d'antiseptiques dans la nourriture larvaire et le miel constitue un autre mécanisme d'immunité sociale. Cependant, l'interaction entre *Nosema* et l'imidaclopride a affecté ce type de défense sociale en induisant une

chute significative de l'activité de la GOX. Par conséquent, si la colonie n'est pas capable de maintenir l'activité de la GOX à un niveau suffisant en recrutant plus d'ouvrières pour cette tâche, une réduction en antiseptique affecterait non seulement les ouvrières mais aussi la survie du couvain. Et même si la colonie parvient à répondre au besoin en antiseptiques par un recrutement massif d'ouvrières, cela réduirait le nombre d'ouvrières impliquées dans les autres tâches et donc un coût pour la colonie. Les mécanismes par lesquels la combinaison *Nosema*/imidaclopride induit une réduction dans l'activité de la GOX ne sont pas connus. Cependant, il est possible que l'interaction entre ces deux

agents accentue le stress énergétique et le coût lié à la production de GOX qui ne peut être compensé par les abeilles.

Alors que les pathogènes ou insecticides seuls n'expliquent pas la perte des colonies d'abeilles, leur interaction peut avoir des effets dévastateurs sur leur santé à la fois sur le court et le long terme. Avec d'un côté une dépendance croissante de l'agriculture aux pollinisateurs, et de l'autre, un déclin des insectes pollinisateurs, plus que jamais, des travaux sont nécessaires pour étudier les interactions entre l'emploi de pesticides pour lutter contre les insectes nuisibles et les pathogènes qui infectent naturellement les insectes pollinisateurs.

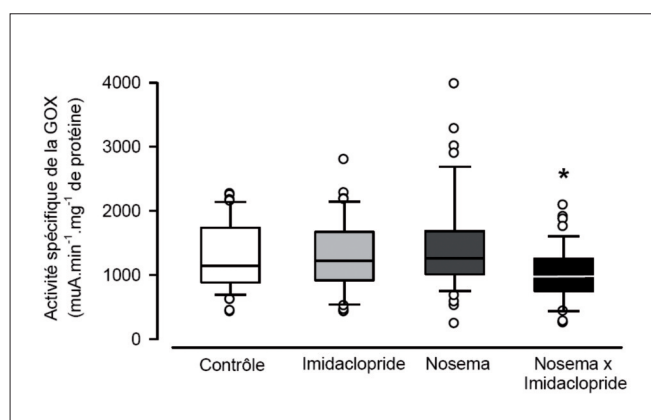


**Figure 3.** Effet d'une infection avec *Nosema* et/ou d'une exposition à l'imidaclopride sur l'immunité individuelle.

A) Taux d'hémocytes et B) Activité de la PO aux jours 5 et 10 chez sept à huit abeilles par cagette. Pour chaque traitement, trois colonies ont été analysées avec deux répliques (cagette) par colonie (N = 120 abeilles par cagette).

Les intervalles entre le premier et le troisième quantile et la médiane sont représentés.

Les cercles représentent les 10 % d'individus situés au-delà de l'écart-type.



**Figure 4.** Effet d'une infection avec *Nosema* et/ou d'une exposition à l'imidaclopride sur l'immunité sociale. Activité de la GOX au jour 10 chez huit abeilles par cagette. Pour chaque traitement, trois colonies ont été analysées avec deux répliques (cagette) par colonie (N = 120 abeilles par cagette). Les intervalles entre le premier et le troisième quantile et la médiane sont représentés. Les cercles représentent les 10 % d'individus situés au-delà de l'écart-type. \* indique une différence significative (test post-hoc de Bonferroni, P < 0,05).

## Remerciements

Nous remercions D. BESLAY, A. MAISONNASSE et les autres membres du laboratoire, ainsi que M. BREHÉLIN, A. KRETZSCHMAR et M.R. SCHMID pour leur aide. Cette étude a été financée par des bourses du département Santé des Plantes et de l'Environnement de l'INRA (C. ALAUX) et du CONICYT/Ambassade de France au Chili (C. DUSSAUBAT), et les programmes Human Frontier Science Program (RGP0042/2007) et Fonds Européen Agricole de Garantie.

## Références bibliographiques

ANTUNEZ K., MARTIN-HERNANDEZ R., PRIETO L., MEANA A., ZUNINO P. and HIGES M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.

BOGDANOV, S. (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37: 1-18.

CHAUZAT M.P., CARPENTIER P., MARTEL A.C., BOUGEARD S., COUGOULE N., PORTA P. et al. (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colony health in France. *Environ Entomol* 38: 514-523.

CORNMAN, R.S., CHEN, Y.P., SCHATZ, M.C., STREET, C., ZHAO, Y., DESANY, B. et al. (2009) Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens* 5 : e1000466.

EVANS J.D., ARONSTEIN K., CHEN Y.P., HETRU C., IMLER J., L. JIANG, H. et al. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15: 645-656.

HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., BOTÍAS C., GARRIDO BAILÓN E., GONZÁLEZ-PORTO A.V., BARRIOS L. et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10: 2659-2669.

KEELING P.J., and Fast, N.M. (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56: 93-116.

NGUYEN B.K., SAEGERMAN C., PIRARD C., MIGNON J., WIDART J., THIRIONET B. et

al. (2009) Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality ? *J Econ Entomol* 102: 616-623.

SANO O., KUNIKATA T., KOHNO K., IWAKI K., IKEDA M., and KURIMOTO M. (2004) Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two dimensional gel electrophoresis. *J Agric Food Chem* 52: 15-20.

SCHMID M.R., BROCKMANN A., PIRK C.W., STANLEY D.W., and TAUTZ J. (2008) Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J Insect Physiol* 54: 439-444.

SCHMUCK R., SCHONING R., STORK A., AND SCHRAMMEL O. (2001) Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., *Hymenoptera*) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57: 225-238.

VAN ENGELSDORP D., EVANS J.D., SAEGERMAN C., MULLIN C., HAUBRUGE E., NGUYEN B.K. et al. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4: e6481

WHITE J.W.J., SUBERS M.H., AND SCHEPARTZ A.I. (1963) The identification of inhibine, antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide, and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochem Biophys Acta* 73: 57-70.

WILSON-RICH N., SPIVAK M., FEFFERMAN N.H., AND STARKS P.T. (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu Rev Entomol* 54: 405-423.

## BULLETIN D'ABONNEMENT

À renvoyer avec votre règlement à : EVO+ - Gestion des abonnements - 31, rue Bernard Mulé - 31400 TOULOUSE

Contact : Anne Cau - Tél. : 05 62 57 60 12 - Mèl : gestionabonnement.evoplus@orange.fr

2010

OUI, JE M'ABONNE AU BULLETIN TECHNIQUE APICOLE POUR L'ANNÉE 2010

Structure .....  
 Nom ..... Prénom .....  
 Adresse complète .....  
 ..... Code postal .....  
 Commune ..... Pays .....  
 Tél. .... Portable .....  
 Fax ..... Mail .....

Pour nous permettre de mieux vous connaître, merci de cocher la ou les case(s) correspondant à votre situation :

- |   |  |
|---|--|
| 1. Apiculteur   | 4. <input type="checkbox"/> Enseignement/recherche       |
| <input type="checkbox"/> Amateur <input type="checkbox"/> Professionnel | 5. <input type="checkbox"/> Administration/collectivité  |
| Nombre de ruches . . . . .  | 6. <input type="checkbox"/> Fournisseur de matériel      |
| 2. <input type="checkbox"/> Formateur                                   | 7. <input type="checkbox"/> Coopérative/négociant        |
| 3. <input type="checkbox"/> Technicien apicole                          | 8. <input type="checkbox"/> Autres. Précisez : . . . . . |

Je choisis la formule d'abonnement suivante :

- France :  
☐ 1 an : 36,00 € dont TVA : 0,74 € ☐ 2 ans : 67,00 € dont TVA : 1,38 €
- Tarif groupe :  
☐ 1 an : 30,00 € à partir de 10 demandes d'abonnement groupées dont TVA : 0,62 €
- CEE, Suisse et DOM TOM :  
☐ 1 an : 42 € ☐ 2 ans : 79 €
- Autres pays :  
☐ 1 an : 44 € ☐ 2 ans : 83 €

Je peux également adhérer à l'OPIDA et ainsi aider à faire vivre l'association :

- Personne physique :  
☐ Cotisation simple : 10,00 € TTC ☐ Cotisation de soutien : 25,00 € TTC
- Personne morale :  
☐ Cotisation simple : 75,00 € ☐ Cotisation de soutien : 160,00 €

Je peux également commander un ancien numéro du Bulletin Technique Apicole :

- ☐ Prix au numéro : 10,00 € TTC - Numéro(s) commandé(s) :  
 [Numéros indisponibles : 76(1-2), 79(1-4), 80(3), 81(4), 82(1-2), 83(4), 84(1-2), 85(1-2), 86(1), 88(1), 90(1), 91(2), 92(2), 93(2,4), 95(2), 96(1-2), 97(1-2)]

Je joins un règlement total de ..... € à l'ordre de l'OPIDA

☐ Par chèque ☐ Par mandat ☐ Par virement

☐ Je souhaite recevoir une facture acquittée

Fait à ..... le ..... 20..

Signature et cachet de la structure :

Nom de la banque	Établissement	Guichet	N° de compte	Clé RIB
Banque Populaire	17807	00017	55319502105	73

Conformément à la loi, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification aux informations vous concernant

Tarifs valables jusqu'au 31/12/2010