

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par contact

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par contact des pesticides et d'autres produits chimiques pour des abeilles domestiques ouvrières adultes. Elle s'inspire principalement de la ligne directrice de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP), destinée à évaluer les retombées des produits de protection des plantes sur les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) (1). Les suggestions émises par la Commission internationale de botanique apicole lors de son cinquième Symposium international sur les risques des pesticides pour les abeilles, qui s'est déroulé à Wageningen (Pays-Bas) en 1993, en vue d'améliorer le test de l'OEPP, ont aussi été prises en considération (2). On s'est également appuyé sur d'autres méthodes existantes (3)(4)(5).

REMARQUES PRELIMINAIRES

2. Lorsqu'on apprécie et évalue les caractéristiques toxiques d'une substance, il peut être nécessaire de déterminer sa toxicité aiguë par contact pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par contact vise à déterminer la toxicité intrinsèque des pesticides et d'autres produits chimiques pour les abeilles. Les résultats de cet essai devraient être mis à profit pour établir la nécessité d'une évaluation plus poussée. Cette méthode peut être utilisée, en particulier, dans des programmes séquentiels destinés à évaluer les risques des pesticides pour les abeilles, selon la progression suivante : essais de toxicité en laboratoire, essais en conditions semi-naturelles et essais sur le terrain (6). Les pesticides peuvent être testés en tant qu'ingrédients actifs ou en tant que préparations chimiques.

3. Un étalon de toxicité doit être utilisé pour vérifier la sensibilité des abeilles et la précision du protocole d'essai.

4. Les définitions de certains termes utilisés figurent en annexe.

PRINCIPE DE LA METHODE

5. Des abeilles domestiques ouvrières adultes sont exposées à une gamme de doses de la substance d'essai dissoute dans un véhicule approprié, par application directe sur le thorax (aérosol). L'essai dure 48 heures. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures alors que la mortalité des témoins reste à un niveau acceptable, c'est-à-dire ≤ 10 pour cent, il convient de prolonger l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. La mortalité est notée tous les jours et comparée avec les valeurs des témoins. On analyse les résultats afin de calculer la DL_{50} à 24 heures et à 48 heures (voir définitions à l'annexe) et, au cas où l'étude est prolongée, à 72 heures et à 96 heures.

VALIDITE DE L'ESSAI

6. La validité de l'essai repose sur les conditions suivantes :
- le taux moyen de mortalité de l'ensemble des témoins ne doit pas dépasser 10 pour cent à la fin de l'essai ;
 - la DL_{50} de l'étalon de toxicité se trouve dans la gamme spécifiée.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Collecte des abeilles

7. Il faudrait utiliser de jeunes abeilles ouvrières adultes de la même race, autrement dit des abeilles du même âge, nourries de la même façon, etc. Elles devraient provenir de colonies saines, correctement nourries, dépourvues autant que possible d'individus malades, possédant une reine dans la ruche et dont on connaît l'histoire et l'état physiologique. Elles pourraient être collectées le matin du jour où elles seront utilisées ou la veille au soir et gardées dans les conditions de l'essai jusqu'au jour suivant. Les abeilles récoltées sur des cadres dépourvus de couvain conviennent. Il faut éviter de collecter les abeilles au début du printemps ou à la fin de l'automne, parce qu'elles subissent un changement physiologique à ces époques. Si les essais doivent être effectués au début du printemps ou à la fin de l'automne, la sortie des abeilles peut se faire dans un incubateur et celles-ci seront ensuite élevées pendant une semaine avec du "pain d'abeille" (pollen récolté sur les rayons) et une solution de saccharose. Les abeilles traitées avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des antivarroa, etc. ne devraient pas être soumises à des essais de toxicité durant quatre semaines à partir de la fin du dernier traitement.

Cages d'essai

8. On utilise des cages faciles à nettoyer et bien ventilées. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en toile métallique, en plastique, des cages jetables en bois, etc. Il est préférable de répartir les abeilles en groupes de dix par cage. La dimension des cages d'essai doit être adaptée au nombre d'abeilles, c'est-à-dire leur fournir un espace suffisant.

Manipulation et conditions d'alimentation

9. Les manipulations et notamment le traitement et les observations peuvent s'effectuer à la lumière (du jour). Une solution de saccharose dans l'eau dont la concentration finale s'élève à 500 g/l (50 pour cent en poids par unité de volume) devrait être utilisée comme nourriture et fournie ad libitum durant toute la durée de l'essai à l'aide d'une mangeoire pour abeilles. Celle-ci peut consister en un tube de verre (d'environ 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm).

Préparation des abeilles

10. Les abeilles récoltées peuvent être anesthésiées avec du dioxyde de carbone ou de l'azote en vue de l'application de la substance d'essai. La quantité d'anesthésiant utilisée et la durée de l'exposition devraient être réduites au minimum. Les abeilles moribondes doivent être enlevées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

Préparation des doses

11. La substance d'essai doit être appliquée sous forme de solution dans un véhicule, à savoir un solvant organique ou de l'eau avec un agent mouillant. Parmi les solvants organiques, on préfère l'acétone, mais d'autres solvants organiques peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde). Dans le cas des préparations chimiques dispersées dans l'eau et des substances organiques fortement polaires non solubles dans les solvants organiques, les solutions peuvent être plus faciles à appliquer si elles sont préparées dans une solution faible d'un agent mouillant commercial (par exemple, Agral, Citowett, Lubrol, Triton, Tween).

12. Des solutions témoins appropriées doivent être préparées ; autrement dit, si un solvant ou un dispersant ont été employés pour solubiliser la substance d'essai, deux groupes de témoins doivent être utilisés, l'un étant traité avec de l'eau et l'autre avec le solvant ou le dispersant.

MODE OPERATOIRE

Groupes testés et groupes témoins

13. Le nombre de doses et de groupes d'essai testés par dose doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la DL_{50} , avec des limites de confiance de 95 pour cent. L'essai demande normalement cinq doses appartenant à une série géométrique dont le facteur n'excède pas 2,2 et qui englobe la DL_{50} . Toutefois, le nombre de doses doit être déterminé en fonction de la pente de la courbe de toxicité (dose en fonction de la mortalité) et en tenant compte de la méthode statistique choisie pour analyser les résultats. Un test de détermination de l'ordre de grandeur permet de choisir les doses appropriées.

14. Il faudrait tester au moins trois groupes d'essai identiques, comportant chacun 10 abeilles, par concentration d'essai.

15. Pas moins de trois groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Si on utilise un solvant organique ou un agent mouillant, trois groupes supplémentaires de 10 abeilles chacune doivent être inclus pour le solvant ou l'agent mouillant.

Étalon de toxicité

16. Un étalon de toxicité devrait être testé parallèlement aux groupes traités. Il faudrait sélectionner au moins trois doses afin d'englober la valeur supposée de la DL_{50} . Chaque dose devrait être testée dans au moins trois cages contenant chacune 10 abeilles. L'étalon de toxicité préféré est le diméthoate, dont la DL_{50} par contact après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,30 μg d'ingrédient actif/abeille (7). D'autres étalons de toxicité pourraient toutefois être acceptables, s'il existe suffisamment de données qui permettent de vérifier la relation dose-effet escomptée (par exemple le parathion).

Exposition

Administration des doses

17. Les abeilles anesthésiées sont traitées individuellement par application locale. Les abeilles sont réparties au hasard entre les différents groupes traités et les groupes témoins. Un volume de 1 µl de solution contenant la substance d'essai à la concentration appropriée doit être appliqué à l'aide d'un microapplicateur sur la face dorsale du thorax de chaque abeille. D'autres volumes peuvent être utilisés si cela se justifie. Après l'application, les abeilles sont réparties entre les cages d'essai dans lesquelles on distribue une solution de saccharose.

Conditions d'essai

18. Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité dans une salle d'expérience chauffée à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. L'humidité relative, comprise normalement entre 50 et 70 pour cent, devrait être enregistrée tout au long de l'essai.

Durée

19. L'essai dure 48 heures. Si la mortalité s'accroît de plus de 10 pour cent entre 24 heures et 48 heures, la durée de l'essai devrait être prolongée jusqu'à 96 heures, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 pour cent.

Observations

20. La mortalité est relevée 4 heures après l'application de la dose, puis 24 heures et 48 heures après celle-ci. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures pendant 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 pour cent. Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

ESSAI LIMITE

21. Dans certains cas (par exemple lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique), un essai limite peut être exécuté, avec 100 µg d'ingrédient actif/abeille, afin de démontrer que la DL_{50} est supérieure à cette valeur. Le même protocole devrait être appliqué, et notamment les trois groupes d'essai identiques pour la dose testée, les témoins nécessaires et l'utilisation d'un étalon de toxicité. Si on constate une mortalité, il convient de mener une étude complète. Si on observe des effets sublétaux (voir paragraphe 20), il faut les noter.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

22. Les résultats devraient être récapitulés sous forme de tableaux, montrant pour chaque groupe traité avec la substance d'essai, ainsi que pour les témoins et les groupes traités avec l'étalon de toxicité, le nombre d'abeilles employé, la mortalité à chaque heure d'observation et le nombre

d'abeilles présentant un comportement anormal. Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, la méthode des probits, la moyenne mobile, la probabilité binomiale) (8) (9). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (24 h, 48 h, et, si nécessaire, 72 h, 96 h) et on calcule les pentes des courbes et les doses létales 50% (DL_{50}) avec des limites de confiance de 95 pour cent. Les corrections relatives à la mortalité des témoins doivent s'effectuer selon la méthode d'Abbott (9)(10). La DL_{50} doit être exprimée en μg de la substance d'essai par abeille.

Rapport d'essai

23. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes (par exemple, stabilité dans l'eau, pression de vapeur) ;
- données concernant l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (pour les pesticides, l'identité et la concentration du ou des ingrédient(s) actif(s)).

Abeilles testées :

- nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte ;
- toute information pertinente sur les colonies dans lesquelles les abeilles ont été récoltées, en particulier l'état de santé, toute maladie des adultes, les prétraitements éventuels, etc.

Conditions d'essai :

- température et humidité relative de la salle d'expérience ;
- conditions d'encagement, en particulier le type, la dimension et le matériau des cages ;
- modalités d'administration de la substance d'essai, par exemple solvant utilisé, volume de solution d'essai appliqué, anesthésiants utilisés ;
- conception de l'essai, par exemple nombre et niveau des concentrations d'essai appliquées, nombre de témoins ; pour chaque concentration d'essai et témoin : nombre de cages et nombre d'abeilles par cage ;
- date de l'essai.

Résultats :

- résultats d'une étude préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur, le cas échéant ;
- données brutes : mortalité à chaque concentration testée et à chaque temps d'observation ;
- courbes dose-effet à la fin de l'essai ;
- valeurs de la DL_{50} avec des limites de confiance de 95 pour cent, à chaque temps d'observation recommandé, pour la substance d'essai et l'étalon de toxicité ;
- méthodes statistiques utilisées pour calculer la DL_{50} ;
- mortalité chez les témoins ;
- autres effets biologiques observés et toute réaction anormale des abeilles ;
- tout écart à la Ligne directrice et toute autre information pertinente.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) EPPO (1992). Guideline on Test Methods for Evaluation the Side-Effects of Plant Protection Products on Honeybees (No.170). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 22, 203-215.
- (2) Harrison E.G. (1993). Proceedings of the Fifth International Symposium on the Hazards of Pesticides to Bees, October 26-28, 1993. Plant Protection Service, Wageningen, Pays-Bas. Report IUBBSS, 14 pp + Appendices, 180 pp.
- (3) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Edited by Dr. Mark R. Lynch. Published by SETAC-Europe, Belgique. Mars 1995.
- (4) Stute, K. (1991). Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Honigbiene. Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren, Teil VI, 23 - 1, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Braunschweig, Allemagne.
- (5) US-EPA (1995). Honey Bee Acute Contact Toxicity Test (OPPTS 850.3020). Ecological Effects Test Guidelines. EPA 712-C-95-147, Washington DC, Etats-Unis.
- (6) EPPO/Conseil de l'Europe. (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, 23 (1), 151-165. Mars 1993
- (7) Gough, H.J, McIndoe, E.C, Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (8) Litchfield, J.T. et Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (9) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London et New-York.
- (10) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

ANNEXEDEFINITIONS

Toxicité aiguë par contact : effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'application locale d'une dose unique de la substance d'essai.

Dose : quantité de substance d'essai appliquée. La dose est exprimée en masse (μg) de substance d'essai par animal testé ($\mu\text{g}/\text{abeille}$).

DL₅₀ (dose létale 50%) par contact : dose unique d'une substance, obtenue par calcul statistique, susceptible d'entraîner la mort de 50 pour cent des animaux lorsqu'elle est administrée par contact. La DL₅₀ est exprimée en μg de la substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être un ingrédient actif ou une préparation chimique contenant un ou plusieurs ingrédients actifs.

Mortalité : un animal est noté comme mort lorsqu'il est complètement immobile.