

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

Détermination de la toxicité pour le développement des mouches du fumier (*Scathophaga stercoraria* L. [Scathophagidae] et *Musca autumnalis* De Geer [Muscidae])

INTRODUCTION

1. Cette Ligne directrice vise à évaluer les effets d'un produit chimique testé sur les différentes étapes du développement de diptères du fumier. Au cours de cet essai, les insectes sont soumis, dans des conditions contrôlées [1], au produit chimique testé versé dans les excréments. Un test plus approfondi, dans lequel les mouches sont exposées aux déjections d'animaux traités au produit chimique testé, est décrit à l'annexe 4.

2. Le scatophage du fumier, *Scathophaga stercoraria* L. (famille des Scathophagidae), et la mouche d'automne, *Musca autumnalis* De Geer (famille des Muscidae), sont considérés comme de bons indicateurs de la toxicité des parasitocides pour le développement des diptères du fumier, principalement pour les raisons suivantes : ensemble, ces espèces couvrent un large spectre géographique. *S. stercoraria* et *M. autumnalis* sont en effet présentes en Europe, en Asie, en Afrique et en Amérique du Nord [2, 3, 4, 5, 6, 7]. En incluant une mouche de la famille des Muscidae, cette Ligne directrice couvre ainsi une zone géographique plus étendue. Par exemple, l'espèce australienne *M. vetustissima* peut être testée de la même manière que *M. autumnalis*, alors que *S. stercoraria* n'existe pas en Australie. Malgré des similitudes, les deux espèces diffèrent par leurs températures de prédilection : le scatophage du fumier évite les températures supérieures à 25 °C et sa présence est avérée en Islande ou en haute altitude dans les Alpes, tandis que la mouche d'automne préfère des conditions de température strictement inverses.

3. Les deux espèces se développent dans les excréments, sont multivoltines, n'ont pas de diapause obligatoire, sont faciles à élever et présentent des cycles de vie courts rendant possible de déterminer en laboratoire les effets du produit chimique testé sur leur développement et leur survie. Des informations complémentaires sont disponibles sur l'écologie des mouches du fumier et leur utilisation à des fins d'essais écotoxicologiques [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

4. En raison du rôle écologique des adultes des espèces retenues pour l'essai (une mouche prédatrice et une coprophage de familles différentes, les larves des deux espèces étant coprophages), la pertinence des résultats de l'essai pour la protection de la faune du fumier et pour la préservation de sa fonction est assurée. En outre, il est bien établi que ces mouches sont des indicateurs très sensibles de la contamination chimique du fumier, en particulier aux endo- et ectoparasitocides [14]. Les premiers résultats

de l'essai inter-laboratoires indiquent que l'ivermectine est plus néfaste à la mouche d'automne qu'au scatophage du fumier [15], mais il n'est pas encore possible de déterminer si la sensibilité des deux espèces est globalement différente. Quoiqu'il en soit, ces mouches ne sont pas représentatives de l'ensemble de l'écosystème du fumier. Par exemple, en raison de leur plus grande taille et de leurs habitudes alimentaires différentes, les coléoptères coprophages vivent dans une niche écologique différente de celle des mouches du fumier.

PRINCIPE DE L'ESSAI

5. Cette étude vise à estimer la toxicité d'un produit chimique testé pour les différentes étapes du développement des diptères du fumier. L'incidence possible du produit chimique d'essai versé dans les excréments sur la maturation des mouches y est comparée au(x) témoin(s) négatif(s) (un test plus approfondi s'appuyant sur du bétail traité pharmaceutiquement est décrit à l'annexe 4). Un témoin positif devra être testé périodiquement (voir § 8). Le produit chimique d'essai est mélangé à de la bouse de vache à laquelle sont ajoutés des œufs (*S. stercoraria*) ou des larves (*M. autumnalis*). Les effets du produit chimique d'essai sont alors évalués dans des conditions contrôlées, après exposition des œufs ou des larves au produit chimique testé, sur les paramètres de mesure suivants (toujours en comparaison avec le témoin) :

- émergence, à savoir sexe et nombre total de mouches adultes apparues ;
- retard d'émergence, indiqué par le taux de développement, c'est-à-dire le nombre de mouches apparues par jour après introduction des œufs ou des larves dans les excréments;
- modifications morphologiques, c'est-à-dire toute anomalie morphologique visible, notamment concernant la taille, les difficultés à émerger correctement, etc.

En fonction du dispositif expérimental, la concentration sans effet observé (CSEO) ou la CE_x (concentration avec x % d'effet, par exemple CE_{50}) peuvent être déterminées.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

6. L'hydrosolubilité, le log K_{oc} et la pression de vapeur du produit chimique testé doivent de préférence être connus pour faciliter la conception de l'expérience. Des informations complémentaires sur le devenir du produit chimique testé dans les excréments, notamment ses temps de dégradation, sont souhaitables. Des précisions concernant la source, le numéro de lot ainsi que la pureté de l'essai et des produits chimiques de référence devront également être fournies.

7. Cette Ligne directrice convient à l'essai de substances hydrosolubles ou insolubles ; néanmoins, le mode d'application du produit chimique testé variera en conséquence. Cette Ligne directrice peut ne pas s'appliquer aux substances dont le coefficient de partage air/sol est supérieur à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 300 Pa à 25°C. D'autres facteurs tels que la forte solubilité dans l'eau ou une adsorption au sol élevée, limitant le potentiel de volatilisation, doivent être pris en compte dans la décision de conduire ou non l'essai. Pour les substances instables, volatiles ou facilement dégradables (par exemple identifiées au moyen de données issues d'un essai selon la Ligne directrice 307), ou quand il existe par ailleurs une incertitude sur le maintien de la concentration nominale dans le sol, des mesures analytiques des concentrations d'exposition au début, en cours et en fin d'essai devraient être considérées.

8. Avant l'utilisation de cette Ligne directrice pour des essais sur les mélanges à des fins réglementaires, il faudra prendre en compte et justifier que les résultats générés fourniront des résultats appropriés à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange.

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

9. L'ivermectine (tech.) est une substance de référence appropriée, dont il est prouvé qu'elle affecte l'émergence des mouches [9, 10, 11, 15]. La substance de référence est testée régulièrement, mais deux options sont possibles :
- La CE_x d'une substance de référence peut être déterminée une à deux fois par an pour garantir que les conditions d'essai en laboratoire sont adéquates et pour vérifier que la réaction des organismes d'essai n'évolue pas significativement dans le temps. La CE_{50} pour le paramètre émergence s'inscrit entre 50 et 150 μg d'ingrédient actif/kg p.s. (*S. stercoraria*) et entre 20 et 60 μg d'ingrédient actif /kg p.s. (*M. autumnalis*) respectivement.
 - Il est néanmoins plus recommandé de tester la substance de référence parallèlement à la détermination de la toxicité de la substance d'essai. Dans ce cas, une concentration est utilisée et le nombre de réplicats est le même que pour le témoin solvant (huit). Des effets significatifs sur l'émergence des mouches adultes sont observés à des concentrations de 100 μg d'ingrédient actif/kg p.s. (*S. stercoraria*) et de 40 μg d'ingrédient actif/kg p.s. (*M. autumnalis*) respectivement.

Il est toujours nécessaire de réaliser un essai de référence lorsqu'un lot de mouches est testé pour la première fois, que celles-ci proviennent d'un élevage existant ou aient été collectées sur le terrain.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. L'essai limite/essai proprement dit est valide si chez les témoins :
- l'éclosion des larves est $\geq 70\%$ du nombre d'œufs introduits (*S. stercoraria*) ;
 - l'émergence d'adultes est $\geq 70\%$ des larves écloses (*S. stercoraria*) ;
 - l'émergence d'adultes est $\geq 60\%$ des larves introduites (*M. autumnalis*) ;
 - l'émergence de mouches adultes commence au bout de 18 ± 2 jours (*S. stercoraria*) ou 13 ± 2 jours (*M. autumnalis*).

Si un essai ne remplit pas les critères de validité mentionnés ci-dessus, il est arrêté, à moins que l'on puisse justifier des raisons de sa poursuite (par exemple, ses résultats peuvent être utiles au choix des concentrations dans un nouvel essai). Les motifs de la poursuite de l'essai figurent dans le rapport.

DESCRIPTION DE L'ESSAI**Matériel**

11. Les récipients d'essai ont une taille appropriée (par exemple béciers en plastique ou en verre de 250 à 500 ml). L'aération est assurée par une pièce de coton ou de mousseline fixée à l'aide d'un ruban sur le haut du bécier.
12. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, et en particulier les articles suivants :
- armoire à séchage ;
 - stéréomicroscope ;
 - pinceaux pour le transfert des œufs ou des larves ;
 - pH-mètre et photomètre ;
 - balances suffisamment précises ;
 - instruments appropriés pour la régulation de la température ;
 - instruments appropriés pour la régulation de l'humidité (ce point n'est pas essentiel si les récipients

ont un couvercle).

Sélection et prélèvement des excréments

13. De la bouse non contaminée sera obtenue de bétail à l'histoire vétérinaire documentée. Les bêtes ne devront avoir reçu aucun produit pharmaceutique depuis au moins 8 semaines, ni traitement anthelminthique en bolus depuis au moins 5 mois lors du prélèvement. Les excréments ne devront contenir aucun produit contaminant susceptible d'interférer avec la conduite de l'étude.

14. Les excréments peuvent être prélevés directement sur le bétail (prélèvement interne ou en sac) ou au sol. S'il est prélevé au sol, il convient de prendre garde d'éviter toute contamination par les urines. La bouse prélevée au sol ne devra pas dater de plus de 2 heures lors du prélèvement, pour minimiser sa colonisation par la faune. Elle devra être congelée avant utilisation à env. -20°C pendant au moins une semaine (de préférence plus longtemps – par exemple quatre semaines), afin d'éviter la contamination par les acariens). La contamination par les acariens étant très improbable pour de la bouse collectée par prélèvement interne, la congélation n'est pas nécessaire dans ce cas de figure. Indépendamment de la méthode de prélèvement, la bouse n'a pas besoin d'être congelée si elle est utilisée immédiatement. Les soins prodigués au bétail fournissant les excréments, en particulier son régime alimentaire, sont consignés. Des échantillons sont prélevés pour déterminer l'humidité et le pH de la bouse (voir annexe 2).

Sélection et préparation des animaux d'essai

15. Les espèces à utiliser au cours de ce bio-essai sont les mouches *Scathophaga stercoraria* (Fig. 1) ou *Musca autumnalis* (Fig. 2). Les insectes seront obtenus par le biais d'un élevage en laboratoire (voir annexe 3). Si des mouches adultes sont prélevées sur le terrain pour amorcer un élevage, l'identité de l'espèce est vérifiée à l'aide d'une clé appropriée [16]. Les colonies développées à partir d'organismes prélevés sur le terrain sont élevées au minimum une génération avant le lancement de l'essai. Le processus de confirmation de l'identité de l'espèce, l'origine et l'histoire des organismes sont documentés. Cet essai utilise des œufs de ponte récente ou des larves nouvellement écloses (moins de 12 heures).



Fig. 1 : *Scathophaga stercoraria*



Fig. 2 : *Musca autumnalis*

Conditions de l'essai

16. Les récipients destinés à l'élevage des mouches et les récipients d'essai seront conservés au sein du laboratoire à une température de $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pour *S. stercoraria* et de $26\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pour *M. autumnalis*. Dans les essais recourant à *S. stercoraria*, l'humidité relative (HR) est $> 60\%$ durant la première phase du test, de manière à éviter le dessèchement des œufs. Un cycle de lumière sera organisé de façon à alterner 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, l'éclairage étant assuré par des tubes fluorescents. Il convient de consigner au début du test l'intensité lumineuse dans la zone des récipients d'essai, au niveau approximatif de la surface des excréments.

PROTOCOLE**Préparation des excréments**

17. Les excréments sont sortis du congélateur à temps pour dégeler complètement avant utilisation (les excréments prélevés directement peuvent être utilisés immédiatement, voir § 13). Ils sont homogénéisés pendant environ 10 minutes, par exemple dans une centrifugeuse de laboratoire, avant la préparation des différents groupes d'essai. Il n'est généralement pas nécessaire de modifier l'humidité (l'expérience a montré qu'une teneur en humidité de 80 % (poids frais) convient aux mouches).

18. La teneur en humidité et le pH d'un échantillon d'excrément provenant de bétail n'ayant reçu aucun produit pharmaceutique depuis au moins 8 semaines, ni aucun traitement anthelminthique en bolus depuis au moins 5 mois lors du prélèvement de la bouse seront mesurés au début de chaque essai. Les excréments sont assez humides pour être facilement assemblés sous la forme d'une boule d'environ 7 cm de diamètre, mais assez secs pour que cette boule conserve sa forme. La teneur en azote et en carbone est calculée (y compris le quotient C/N). Les méthodes utilisées pour la mesure de ces paramètres seront consignées. Des méthodes possibles de détermination des paramètres sont exposées à l'annexe 2.

Application des produits chimiques d'essai

19. Toutes les concentrations d'essai sont exprimées en fonction du poids sec pour assurer la comparabilité des résultats entre études.

20. Une quantité donnée d'excrément sera placée dans la grande centrifugeuse du laboratoire. Les substances d'essai et de référence seront versées dans un volume donné d'eau. Si ces produits sont peu solubles dans l'eau, ils seront versés dans un volume donné de solvant organique volatil comme l'acétone ou l'éthanol (en fonction de la solubilité du produit chimique testé, il a été montré que 1 à 10 ml/120 g p.s. d'excréments conviennent) et mélangés avec soin pendant environ 10 minutes. Les excréments témoins seront inoculés soit avec un volume donné de solvant (témoin solvant seul), soit avec un volume approprié d'eau seule (témoin non traité). Après quoi les excréments et leur additif seront mélangés avec soin. Lorsqu'un solvant véhicule est utilisé, le solvant doit pouvoir s'évaporer complètement, pendant au moins 4 heures à température ambiante, avant l'ajout des organismes d'essai.

21. Les concentrations d'essai sont confirmées par une vérification analytique appropriée. L'analyse de la concentration la plus élevée des solutions d'essai, associée à la documentation sur les dilutions consécutives, et l'utilisation d'applicateurs étalonnés (par exemple, verrerie analytique étalonnée, étalonnage du pulvérisateur) permettent de confirmer la vérification de toutes les concentrations pour les matériaux solubles.

Préparation des récipients d'essai et ajout des organismes

22. 100 g d'excrément (poids frais) seront ajoutés à chaque récipient d'essai, ce qui conduira à une épaisseur d'excrément dans les récipients de 5 à 8 cm. Les œufs (*S. stercoraria*) ou les larves (*M. autumnalis*) servent de point de départ à ce bio-essai et s'obtiennent en suivant les méthodes d'élevage spécifiques à l'espèce.

23. Il est recommandé de commencer l'essai portant sur *S. stercoraria* avec des œufs, et d'utiliser des

larves dans le test recourant à *M. autumnalis*, essentiellement pour des raisons pratiques. Les œufs/larves récoltés seront divisés en groupes correspondant au nombre de traitements. Cela permettra que le transfert des organismes vers un type d'excréments particulier n'occasionne pas de contamination croisée. La répartition des œufs/larves entre les groupes de traitement s'opère de façon progressive, par petits lots, de sorte à accroître la part de hasard dans leur distribution. Jusqu'à leur utilisation, les groupes d'œufs sont conservés sur du papier filtre humide dans un récipient fermé.

24. Dix œufs de *S. stercoraria* ou dix larves de *M. autumnalis* seront placés à la surface des excréments dans chaque récipient d'essai. Si des œufs sont utilisés, ils devront être posés à la surface des excréments sur du papier filtre humide, pour permettre d'évaluer le nombre d'éclosions (critère de validité). Tout de suite après leur éclosion, les larves de *S. stercoraria* quitteront le papier filtre, s'exposant ainsi aux excréments.

25. Après l'ajout des larves de *M. autumnalis*, lorsque les larves ne seront plus visibles, la surface des excréments devra être recouverte de vermiculite sèche, jusqu'à une épaisseur d'environ 3 cm. La vermiculite est un substrat bien adapté à la pupation. Cet ajout ne paraît pas nécessaire lors d'essais utilisant *S. stercoraria*.

Observations

26. Lorsque des œufs servent de point de départ à l'expérience (c'est-à-dire lors de l'essai avec *S. stercoraria*), le nombre d'œufs éclos avec succès est évalué 48 heures après leur ajout aux excréments. Durant la période d'émergence des adultes, le sexe et le nombre d'adultes émergeant et le taux de survie s'ensuivant sont consignés quotidiennement. Lorsque le sexe des adultes récemment émergés est incertain, les mouches sont laissées 2 à 3 heures avant une nouvelle tentative d'évaluation de leur sexe. Toute anomalie morphologique visible (notamment concernant la taille, les difficultés à émerger correctement, etc.) devra elle aussi être consignée. Les mouches émergeant (y compris les mouches mortes) devront être écartées quotidiennement. Lors des essais avec *S. stercoraria*, l'émergence des adultes commence environ 18 jours après le début de l'expérience. Lors des essais avec *M. autumnalis*, elle commence au bout d'environ 13 jours. L'essai prendra fin cinq jours après l'émergence de la dernière mouche adulte du témoin. Les adultes sont euthanasiés humainement, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation.

Plan de l'essai

27. Essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai : si la toxicité du produit chimique d'essai est inconnue, l'expérience est menée sur cinq concentrations d'essai nominales de 0.1, 1.0, 10, 100 et 1000 mg/kg (poids d'excréments sec), plus un témoin non traité et un témoin solvant (si le solvant n'est pas de l'eau). Si des informations sont disponibles sur la toxicité du produit, les concentrations d'essai peuvent être adaptées en conséquence (voir § 28). Toutes les concentrations d'essai sont en outre exprimées en fonction du poids sec.

28. Essai limite ou essai proprement dit : si l'essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai indique que la concentration sans effet observé (CSEO) du produit chimique d'essai est supérieure aux concentrations testées (par exemple 1000 mg/kg d'excréments p.s.), un essai limite pourra être mené à

la concentration appropriée (généralement 1000 mg/kg d'excréments p.s.) à la place de l'essai proprement dit. L'essai limite portera sur huit récipients d'essai traités et huit récipients non traités. Une substance de référence et un témoin solvant (si le solvant n'est pas de l'eau) seront également inclus (huit expériences identiques chacun). Cette méthode a été choisie d'après le Document d'orientation de l'OCDE n°54 [24].

29. Si des effets du produit chimique testé sont observés dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai (corrigée en fonction de la mortalité des témoins selon la formule d'Abbott (1925) [25]), l'essai proprement dit sera mené. Il pourra adopter une méthode fondée sur la CSEO ou sur la CE_x :

- pour déterminer la CSEO, au minimum cinq concentrations formant une série géométrique devront être testées. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandés. Les concentrations devront être séparées par un facteur n'excédant pas 1.8 ;
- pour déterminer la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), douze concentrations devront être testées. Au minimum deux expériences identiques par concentration d'essai plus six témoins identiques sont recommandés. Le facteur d'espacement peut varier : il sera inférieur à deux dans la gamme censée produire un effet et supérieur à deux aux concentrations supérieures et inférieures.

Outre un témoin non traité et un témoin solvant (si le solvant n'est pas de l'eau), une substance de référence sera testée (pas dans tous les cas, voir § 8).

30. Le biais positionnel sera écarté en utilisant un schéma complet randomisé par blocs pour toutes les études menées (essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, essai limite ou essai proprement dit).

ÉVALUATION STATISTIQUE

31. La présente Ligne directrice ne donne aucune orientation statistique précise concernant l'analyse des résultats de l'essai. Néanmoins, sur la base des recommandations récentes formulées dans d'autres Lignes directrices de l'OCDE (principalement le Document d'orientation sur les statistiques [24], mais également d'autres Lignes directrices de publication récente [26], en particulier [27]), certaines propositions peuvent être faites. Le présent document porte essentiellement sur la détermination de la CE_x . D'après la Ligne directrice récemment publiée par le VICH [28], la CE_{50} est demandée par de nombreuses autorités réglementaires (par exemple dans l'Union européenne), essentiellement pour des motifs statistiques et écologiques. Quoi qu'il en soit, pour une plus grande souplesse, des indications sont également données sur la détermination de la CSEO [26, 27].

32. Le nombre d'adultes émergés de chaque sexe pour chaque concentration du produit chimique d'essai sera présenté sous la forme d'un tableau. L'ensemble des autres observations sera également fourni sous forme tabulaire. On utilisera comme paramètres le nombre de mouches adultes émergées, le taux de développement par traitement et les évolutions morphologiques constatées, toujours comparativement au témoin. Le taux de développement sera déterminé suivant la méthode déjà décrite dans la Ligne directrice relative à l'Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé [27].

RAPPORT D'ESSAI

33. À l'issue de l'étude, un rapport final sera rédigé. Il inclura les informations suivantes (sans s'y

limiter) :

Produit chimique testé : nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes :

Données d'identification chimique;

- - Substance mono-constituant :
apparence physique, hydro-solubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;
identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).
- - Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :
caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Espèces soumises à l'essai :

- Espèces utilisées pour l'essai (confirmation de l'espèce, source et conditions d'élevage)
- Manipulation des organismes
- Âge des organismes au moment de leur dépôt dans les récipients d'essai

Conditions d'essai :

- Origine des excréments et histoire vétérinaire récente du bétail utilisé
- pH et teneur en humidité des excréments
- Épaisseur des excréments dans les récipients d'essai
- Épaisseur de vermiculite dans les récipients d'essai (uniquement pour *M. autumnalis*)
- Récipients d'essai (matériau, volume et dimensions)
- Concentrations d'essai et nombre d'expériences identiques
- Description de la préparation des solutions d'essai et de référence
- Conditions ambiantes (température, cycle et intensité de lumière, humidité)

Résultats de l'essai :

- Nombre de mouches mâles et femelles émergées par récipient et par jour
- Pourcentage d'émergence par expérience identique et concentration d'essai (regroupement des résultats se rapportant aux mâles et aux femelles)
- Anomalies morphologiques (par exemple concernant la taille) par expérience identique
- Taux de développement par expérience identique
- Taux d'éclosion par expérience identique (dans les essais commencés avec des œufs)
- Résultats des essais menés avec la substance de référence
- Présentation des résultats sous forme de tableau et/ou de graphique
- Estimation des effets toxiques observés (par exemple CEx, CSEO), et méthodes statistiques employées pour les déterminer

Évaluation des résultats de l'essai :

- Conformité aux critères de validité
- Examen/discussion des résultats obtenus
- Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Hughes, J. (2003): Draft Protocol. Determination of Acute Toxicity of a Test Chemical to Dung Flies. A standardised bioassay procedure for *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae), *Musca vetustissima* Walker (Diptera: Muscidae) and *Scathophaga stercoraria* L. (Diptera: Scatophagidae). Unpublished Report, Invesresk Ltd., UK, 8 pp.
- [2] Cotterell, G. (1920): The life-history and habits of the yellow dung-fly (*Scathophaga stercoraria*); a possible blow-fly check. Proceedings of the Zoological Society of London, 629-647.
- [3] Sack, P. (1937): 62a Cordyluridae. In: E. Lindner, (Ed.). Die Fliegen der Palaearktischen Region, pp. 1-103.
- [4] Hackman, W. (1956): The Scatophagidae (Dipt.) of eastern Fennoscandia, Tilgmann, Helsingforsiae, pp. 1-67.
- [5] Gorodkov K.B. (1984): 100. Family Scatophagidae. In: Keys to the Insects of the European Part of the USSR, pp. 732-759.
- [6] Blume R.R. (1985): A checklist, distributional record, and annotated bibliography of the insects associated with bovine droppings of pastures in America north of Mexico. Southwest. Entomol. Suppl. 9: 1-54.
- [7] Sifner F. (2003): The family Scatophagidae (Diptera) of the Czech and Slovak Republics (with notes on selected Palaearctic taxa). In: Acta musei nationalis Pragae, series B-Historia Naturalis. 59: 1-90.
- [8] Kunz, S. E., Murrell, K.D. et al. (1991): Estimated losses of livestock to pests. CRC Handbook of Pest Management in Agriculture. 2nd. Ed., Boston, CRC Press, Inc. I: 69-105.
- [9] Webb, J. D., Burg, J.G. et al. (1991): Moxidectin Evaluation against *Solenoptes capillatus* (Anoplura: Linognathidae), *Bovicola bovis* (Mallophaga: Trichodectidae), and *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) on Cattle. Journal of Economic Entomology 84: 1266-1269.
- [10] Sommer, C., Steffansen, B., Overgaard Nielsen, B. Gronvold, J., Vagn Jensen, K.M., Brochner, J., Jespersen, J., Springborg, J. and Nansen, P. (1992): Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. Bulletin of Entomological Research 82: 257-264.
- [11] Strong, L. and James, S. (1993): Some effects of rearing the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* in cattle dung containing Ivermectin. Entomol. Exp. Appl. 63: 39-45.
- [12] Surgeoner, G.A., Lindsay, L.R. and Heal, J.D. (1996). Field Evaluation of Eliminator, Protector and Stockaid Ear Tags for Control of Face Flies and Pyrethroid-Resistant Horn Flies on Beef Cattle. University of Guelph, Canada. <http://bru.aps.uoguelph.ca/articles96>.
- [13] Bernasconi, M.V., Pawlowski, J., Valsagiacomo, C., Piffaretti, J-C. and Ward, P.I. (2000): Phylogeny of the Scatophagidae (Diptera, Calypttratae) based on mitochondrial DNA sequences.

Molecular Phylogenetics & Evolution 16: 308-315.

- [14] Blanckenhorn, W.U. (2007): Causes and Consequences of Phenotypic Plasticity in Body Size: The case of the Yellow Dung Fly *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae). In press in *Insect phenotypic plasticity* (ed. by T.N. Ananthakrishnan and P.S. Whitman).
- [15] Römbke, J., Barrett, K., Gray, J., Knäbe, S., Lehmus, J., Rosenkranz, B., Sekine, T. Scheffczyk, A., Schmidt, T. & Sharples, A. 2006. Results of an International Ring test according to the Draft Guideline “Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies (*Scathophaga stercoraria* L. (*Scathophagidae*), *Musca autumnalis* De Geer (*Muscidae*)). In prep.
- [16] Skidmore P. (1991): Insects of the British cow-dung community. Field Studies Council. Occasional Papers Series No. 21. Shrewsbury, UK. 166 pp.
- [17] ISO 11461 (2001) : Qualité du sol -- Détermination de la teneur en eau du sol en fraction volumique, à l'aide de carottiers -- Méthode gravimétrique.
- [18] ISO 10390 (2005) : Qualité du sol -- Détermination du pH.
- [19] Tilman, D. and Wedin, D. (1991): Plant traits and resource reduction for five grasses growing on a nitrogen gradient. *Ecology* 72: 685-700.
- [20] Hesse, P.R. (1971): A textbook on soil chemical analysis. John Murray, London.
- [21] ISO 10694 (1995a) : Qualité du sol -- Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche.
- [22] ISO 11261 (1995b) : Qualité du sol -- Dosage de l'azote total -- Méthode de Kjeldahl modifiée.
- [23] ISO 13878 (1998) : Qualité du sol -- Détermination de la teneur totale en azote par combustion sèche (« analyse élémentaire »).
- [24] OCDE (2004) : Draft Guidance Document on the statistical analysis of ecotoxicity data. Publications environnement, santé et sécurité, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations. 214 pp.
- [25] Abbot, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.
- [26] OCDE n° 220 (2003) : Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. Essai n° 220 : Essai de reproduction chez l'enchytrée.
- [27] OCDE n° 218 (2004) : Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. Essai n° 218 : Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé.

- [28] VICH (2005): Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – Phase II Guidance. VICH Guideline 38 (Ecotoxicity Phase II), Bruxelles (Belgium), October 2004.
- [29] Failes, E.S., Whistlecraft, J.W. and Tomlin, A.D. (1992): Predatory behaviour of *Scatophaga stercoraria* under laboratory conditions. *Entomophaga* 37: 205-213.
- [30] Lumaret, J-P., Alvinerie, M., Hempel, H., Schallnaß, H-J., Claret, D. & Römbke, J. (2006): New screening test to predict the potential impact of ivermectin-contaminated cattle dung on dung beetles. *Veterinary Research* 38: 15-24.
- [31] ISO 10694 (1995): Qualité du sol -- Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche.

ANNEXE 1**DÉFINITIONS**

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice :

La CSEO (concentration sans effet observé) est la concentration la plus élevée de substances d'essai à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0.05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

La CE_x (concentration efficace à x %) est la concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, la CE_{50} est la concentration dont on estime qu'elle engendre un effet de 50 % sur une variable de l'expérience au sein de la population d'essai au terme d'une période d'exposition donnée. Dans cet essai, les concentrations efficaces sont exprimées en masse du produit chimique testé par masse sèche d'excréments.

ANNEXE 2

DÉTERMINATION DU pH DU DES EXCREMENTS

La méthode de détermination du pH d'un échantillon d'excréments décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390 : Qualité du sol -- Détermination du pH [18]. Laissez sécher une quantité définie d'excréments à température ambiante pendant au moins 12 heures. Confectionnez une suspension d'excréments (contenant au moins 5 g d'excréments) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1.0 M de qualité pour analyse ou d'une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) 0.01 M de qualité pour analyse. Agitez énergiquement la suspension durant cinq minutes. Laissez reposer la suspension durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. Mesurez le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure avec une série appropriée de solutions tampons (pH 4.0 et 7.0, par exemple).

La teneur en humidité peut être déterminée par la pesée de trois échantillons identiques d'excréments d'environ 20 g dans des récipients et par leur séchage pendant une nuit dans un four à environ 105 °C [17]. Les échantillons sont ensuite retirés du four, refroidis à température ambiante dans un dessiccateur et une nouvelle fois pesés. La teneur en humidité est calculée et exprimée en fonction de cette masse après traitement dans le four. Le pH des excréments peut être déterminé en ajoutant un volume d'excréments donné préalablement pesé à une solution de chlorure de potassium 1.0 M ou de chlorure de calcium 0.01 M dans un tube à essai, puis par la mesure du pH à l'aide d'un pH-mètre étalonné [18]. Le ratio entre les excréments et la phase aqueuse est de 1 : 5 v/v.

La teneur en azote peut être déterminée par la méthode de Tilman et Wedin [19] ou selon la procédure de micro-Kjeldahl telle que la décrit Hesse [20]. Ici encore, les méthodes de l'ISO seront préférées [21, 22, 23]. De même, la teneur en carbone des excréments sera déterminée en s'inspirant des Lignes directrices de l'ISO, par exemple [31].

ANNEXE 3

ÉLEVAGE DES MOUCHES DU FUMIER

Méthode d'élevage en laboratoire de *Musca autumnalis* De Geer (diptères : Muscidae)

Ce document décrit la procédure utilisée par Inveresk Research pour l'élevage de *M. autumnalis*.

1. Conditions ambiantes et encagement

L'élevage est pratiqué dans des compartiments en plastique (env. 50 x 50 x 50 cm) munis de boîtiers de chauffage externes.

Les conditions ambiantes sont de 30 ± 2 °C et > 60 % HR. Toutes les indications temporelles données ici sur le développement des insectes s'appuient sur cette température et sont réévaluées si des températures plus basses sont retenues.

Le régime lumineux est de 16 heures de jour pour 8 heures d'obscurité. Outre l'éclairage par tubes fluorescents, une source de lumière incandescente (tel qu'un spot à filament de tungstène) peut être fournie pour créer une zone où les mouches puissent se chauffer.

2. Alimentation

- L'eau est fournie à volonté dans chaque cage par le biais d'un gobelet rempli d'eau retourné sur une plaque tapissée de papier absorbant.
- Poudre de jaune d'œuf séché, poudre de lait et sucrose (ratio de 1:1:1) sont fournis à volonté.
- De la laine de coton imprégnée d'une solution au miel (solution au miel à 25 % p/v) est fournie et remplacée env. deux fois par semaine.
- Du foie de porc frais est fourni chaque semaine comme source de protéines supplémentaire pour les femelles (ce sont surtout les femelles qui se nourrissent des sécrétions faciales du bétail, riches en protéines). Les lamelles de foie sont suspendues à des crochets fixés aux murs de la cage.

3. Ponte des œufs

- Les excréments sont prélevés sur du bétail à l'histoire vétérinaire documentée. Celui-ci ne devra avoir reçu aucun produit pharmaceutique depuis au moins 8 semaines, ni traitement anthelminthique en bolus depuis au moins 5 mois lors du prélèvement. Les excréments sont congelés à env. -20 °C après le prélèvement et stockés à cette température jusqu'au jour de leur utilisation. Il sont dégelés à température ambiante env. 24 heures avant leur ajout à l'élevage.
- Dans une culture non synchronisée, la bouse de vache est fournie une fois par semaine. Dans une

culture synchronisée, elle est fournie lorsque les mouches adultes ont entre 7 et 10 jours, 3 à 4 jours avant l'observation des premiers accouplements.

- Les excréments dégelés sont homogénéisés dans une centrifugeuse de laboratoire pendant env. 10 minutes avant leur ajout à l'élevage de mouches. Ils sont suffisamment humides pour être facilement assemblé sous la forme d'une boule d'environ 7 cm de diamètre, mais assez secs pour que cette boule conserve sa forme. Cette boule est posée sur une plaque de plastique pour produire une bouse artificielle. Elle est ensuite introduite dans l'élevage.
- Chaque lot d'excréments sur lequel les mouches ont pondu est transféré dans environ 1 kg de bouse dans un seau en plastique. Si la densité des œufs est élevée, ceux-ci sont divisés de façon à ce qu'environ 500 œufs au maximum soient transférés à chaque lot d'excréments de 1 kg.
- 48 heures après la ponte, environ 3 cm de sciure sont ajoutés à la surface des excréments, puis le seau est recouvert d'un tissu à mailles fines ou en mousseline (un revêtement de couches est idéal ici). Les larves migreront à la surface des excréments et dans la sciure pour se transformer en pupes.

4. Cycle de vie et étapes du développement

- Les œufs se présentent tantôt sous la forme d'unités, tantôt en amas. Ils se trouvent pour l'essentiel en dessous de la surface des excréments et seul leur siphon respiratoire terminal est apparent. Les amas d'œufs peuvent être retirés des excréments et délicatement désassemblés pour les besoins de l'expérience.
- L'éclosion des œufs se produit au bout d'environ 24 à 36 heures. Si l'expérience requiert des larves, il convient de les retirer des excréments environ 48 heures après l'éclosion.
- Il existe trois stades larvaires. Au cours du troisième stade, les larves sont des asticots cylindriques de couleur blanche à jaune effilés vers l'avant, d'environ 12 mm de long. Les larves « migrent » généralement environ 4 jours après l'éclosion des œufs, se dirigeant vers la surface des excréments et la couche de sciure pour se transformer en pupes.
- Les pupes peuvent être retirées de la sciure 6 jours après l'éclosion des œufs et introduites dans l'élevage. Il est aussi possible de les laisser émerger d'elles-mêmes des excréments. Elles sont de couleur blanc gris et mesurent entre 5 et 7 mm de long.
- L'éclosion des adultes a lieu 4 à 5 jours après la formation des pupes. Le développement d'une mouche du stade de l'œuf à celui de la mouche adulte prend donc 10 à 11 jours à 30 °C. À 25 °C il en prend environ 17.
- Les adultes font 7 à 8 mm de long. Les femelles se distinguent aisément des mâles par la position de leurs yeux : ceux des mâles se touchent presque, tandis que ceux des femelles sont nettement séparés.

Personne-ressource sur *Musca autumnalis* De Geer (diptères : Muscidae)

Professeur Roger D. Moon
Université du Minnesota, Département d'entomologie
219 Hodson Hall

1980 Folwell Ave
Saint-Paul, MN
États-Unis
Tél. : 001 612 624 3636
Fax : 001 612 625 5299
Courriel : rdmoon@umn.edu

Méthode d'élevage en laboratoire de *Scathophaga stercoraria* L. (diptères : Scathophagidae)

Ce document décrit la procédure utilisée par l'Université de Zurich (Prof. Dr. W. Blanckenhorn) pour l'élevage de *S. stercoraria*, partiellement complétée par des informations issues de la littérature, notamment [29].

1. Conditions ambiantes et encagement

Les élevages seront abrités dans des cages maillées (par exemple d'une superficie de 0.09 m²), comprenant une source d'eau, de miel et un peu de pollen du commerce. Cette superficie convient à 25 couples de *S. stercoraria*.

Les conditions ambiantes sont de 20 ± 2 °C et 60 ± 5 % HR. Toutes les indications temporelles données ici sur le développement des insectes s'appuient sur cette température et sont réévaluées si des températures plus basses sont retenues. Le régime lumineux est de 16 heures de jour pour 8 heures d'obscurité.

2. Alimentation

- L'eau est fournie à volonté dans chaque cage par le biais d'un gobelet rempli d'eau retourné sur une plaque tapissée de papier absorbant.
- 7 g de puparia de *Musca domestica* par cage (venant d'un autre élevage en laboratoire) sont ajoutées deux fois par semaine pour garantir une quantité suffisante de proies.

3. Ponte des œufs

- Les excréments sont prélevés sur du bétail à l'histoire vétérinaire documentée. Ceux-ci ne devront avoir reçu aucun produit pharmaceutique depuis au moins 8 semaines, ni traitement anthelminthique en bolus depuis au moins 5 mois lors du prélèvement. Les excréments sont congelés à env. -20 °C après le prélèvement et stockés à cette température jusqu'au jour de leur utilisation. Il sont dégelés à température ambiante pendant env. 24 heures avant leur ajout à l'élevage. Avant leur utilisation, les excréments décongelés sont homogénéisés dans une centrifugeuse de laboratoire pendant environ 10 minutes.
- Lorsque les mouches (*S. stercoraria*) atteignent l'âge de 13 jours, une boîte de Petri de 15 cm contenant de la bouse de vache fraîche est ajoutée avec des proies.
- Ce milieu de ponte est retiré après 24 heures et ajouté à 1500 – 2000 g supplémentaires de bouse de vache versée sur un substrat de sable dans un bac en plastique ouvert.
- La pupation s'achève sous dix jours ; les pupariums sont alors extraits du sable par flottation.

Personne-ressource sur *Scathophaga stercoraria* L. (Scathophagidae)

Professeur Wolf Blanckenhorn
Zoologisches Museum ; Universität Zürich-Irchel; 34 (Gebäude)-J (Stock) -40 (Büro)
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zurich

Tél. : +41 (0)44 635.47.55 Fax : +41 (0)44 635.47.80

Courriel : wolfman@zoolmus.unizh.ch

http://www.unizh.ch/zoolmus/zmneu/forschung/blanckenhorn_wolf.html

ANNEXE 4

**ESSAI PRATIQUÉ SUR DES EXCRÉMENTS PROVENANT DE BÉTAIL TRAITÉ PAR
PRODUITS PHARMACEUTIQUES VÉTÉRINAIRES**

Au lieu d'utiliser des excréments dopés avec un produit chimique testé, les deux espèces de mouche peuvent être exposées à des excréments provenant d'animaux d'élevage (généralement des bovins) eux-mêmes traités à cette substance. Ce modèle expérimental est jugé plus réaliste, puisqu'il tient compte de l'ensemble des phénomènes du métabolisme se déroulant pendant le passage du produit dans le corps de l'animal. En outre, cette situation d'exposition reflète la présence réelle du produit chimique testé dans les excréments, qui peut différer de celle obtenue après versement et homogénéisation. C'est pourquoi ce type d'essai approfondi peut être nécessaire à un échelon d'évaluation plus élevé, afin d'estimer le risque potentiel présenté par un produit pharmaceutique pour les organismes du fumier. Néanmoins, il convient de se rappeler que même lorsque les soins prodigués au bétail (par exemple son alimentation) sont aussi identiques que possible d'une bête à l'autre, les résultats peuvent présenter une plus grande variabilité que dans les essais menés sur des excréments dopés, en raison des différences de métabolisme d'un animal à l'autre.

Pour l'essentiel, l'essai est réalisé comme décrit dans le corps de la présente Ligne directrice. C'est pourquoi ne sont indiqués ci-dessous que les points devant être modifiés (par exemple, aucun changement n'interviendra concernant l'essai de référence, les critères de validité ou l'élevage des deux espèces de mouche). Outre les modifications indiquées ci-dessous, des précisions devront être apportées sur le matériel utilisé pour inoculer le bétail avec le produit chimique testé (en fonction de la formulation utilisée, par exemple, seringue), de même qu'une description des animaux traités (race, âge, poids ; soins, notamment alimentation ; fréquence et nombre des traitements au produit chimique testé).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ :

Par. 5, 6 Outre les propriétés physico-chimiques Du produit chimique testé, la formulation utilisée dans l'expérience t décrite.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Par. 21 Comme il n'est pas possible de prévoir dans le détail quelle quantité de produit chimique testé apparaîtra dans les excréments, il convient d'analyser ceux-ci à la recherche du produit chimique testé et de ses principaux métabolites. L'analyse des résidus est réalisée aussi longtemps que le produit chimique testé apparaîtra dans les fèces du bétail traité.

Par. 22 Les excréments issus de bétail traité sont prélevés à différentes dates après le traitement, en fonction du profil d'excrétion du produit chimique testé (par exemple, pour une formulation à verser contenant de l'ivermectine, des échantillons ont été prélevés jusqu'à 12 jours après le traitement [30]). Les échantillons d'excrément d'un même animal et d'un même jour sont associés et mélangés de manière à obtenir un lot homogénéisé. 100 g (f.w.) de chaque lot sont prélevés pour chaque expérience identique (= récipient).

Par. 27 Selon l'objectif de l'étude, on peut utiliser le même modèle d'expérience que dans les essais avec excréments dopés, puisque chaque échantillon d'excrément provenant de bétail traité contient une concentration différente du produit chimique testé en fonction du profil

d'excrétion. C'est pourquoi des essais limite (une seule date d'échantillonnage) ou des modèles dose-réponse (CEx, CSEO) sont possibles. Pour les mêmes raisons, il n'y a pas non plus de différence en ce qui concerne l'évaluation statistique.

Par. 33 Dans le rapport d'essai, des informations sur les modifications apportées à l'expérience décrites à l'annexe 4 devront être présentées.