

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

Essai de toxicité larvaire chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*), par exposition unique

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice (LD) 237 décrit un essai de toxicité aiguë sur un couvain d'abeilles dans des conditions de laboratoire. Elle s'appuie sur une méthode mise au point en France (1, 2, 3) qui a été soumise à des essais inter-laboratoires de 2005 à 2008 dans sept laboratoires européens (4).
2. Cette Ligne directrice répond aux exigences formulées par les États-Unis, le Canada et l'Europe (5, 6, 7) pour tester la toxicité de produits chimiques sur des larves nourries avec des aliments enrichis, en conditions de laboratoire et selon une stratégie de niveau 1.
3. La méthode vise à déterminer la dose létale (DL₅₀ à 72h) soixante-douze heures après une exposition unique des larves à un produit chimique (en particulier matière active ou préparation pesticide). Les données doivent être utilisées dans un schéma d'évaluation des risques approprié pour un couvain d'abeilles. Cette Ligne directrice pour les essais sur larves d'abeilles complète les LD 213 (8) et 214 (9) de l'OCDE sur des abeilles domestiques jeunes adultes et doit être considérée comme un essai de niveau inférieur dans le cadre d'un schéma d'évaluation globale des risques pour les abeilles (4).

PRINCIPE DE L'ESSAI

4. Le premier jour (J1) de l'étude, des larves synchronisées au premier stade larvaire (L1) (c'est-à-dire des larves du même âge) sont retirées du cadre de trois colonies et placées individuellement dans une plaque 48 puits où elles reçoivent une quantité normalisée de nourriture artificielle. Le quatrième jour (J4) de l'essai, une dose unique du produit chimique testé est ajoutée à la nourriture des larves dans une série de cinq concentrations croissantes. Les mortalités sont enregistrées à J5, J6 et J7 de l'essai. La DL₅₀ à 72 h est calculée pour les larves (mortalité cumulée à J7).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

5. L'hydrosolubilité, la solubilité dans le solvant et la pression de vapeur du produit chimique testé doivent être connues. Les informations utiles sur le produit chimique testé doivent être fournies, notamment sa formule structurale, sa pureté, sa stabilité dans l'eau et à la lumière, ainsi que le coefficient de partage octanol-eau (K_{oc}). L'apparence physique et la source (numéro du lot de fabrication/conditionnement) de la substance d'essai doivent être renseignées. Le document d'orientation n° 23 de l'OCDE fournit des indications sur le traitement des substances que leurs propriétés physico-chimiques rendent difficiles à tester (10).

PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE

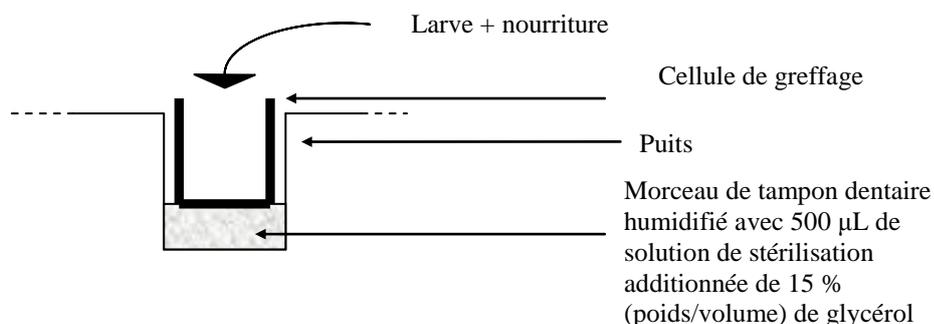
6. Le produit chimique toxique de référence est le diméthoate de qualité technique (CAS RN. 60-51-5). Cet étalon toxique est testé dans le but de s'assurer de la sensibilité et de la fiabilité du dispositif d'essai. Une dose de $8.8 \pm 0.5 \mu\text{g}$ de matière active (m.a.) / larve, dissoute dans un maximum de $3 \mu\text{L}$ d'eau, est mélangée à la nourriture juste avant d'être administrée à la larve à J4 (2, 3).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

7. Pour que le test soit valide, les critères suivants s'appliquent :
- dans la ou les plaque(s) témoin(s), la mortalité cumulée des larves de J4 à J7 doit être $\leq 15 \%$ parmi les réplicats ;
 - dans le traitement correspondant au produit chimique toxique de référence, la mortalité larvaire (après ajustement, voir le paragraphe 33) doit être $\geq 50 \%$ à J7.

DESCRIPTION DE LA METHODE EXPERIMENTALE**Appareillage**

8. Les larves sont élevées dans des cellules de greffage en polystyrène cristal (par exemple, réf. CNE/3, société NICOTPLAST) de 9 mm de diamètre intérieur et de 8 mm de profondeur. Les cellules sont d'abord stérilisées, par exemple par immersion pendant 30 minutes dans de l'éthanol ou une autre solution stérilisante, puis séchées sous hotte à flux laminaire. Chaque cellule est placée dans un puits d'une plaque 48-puits. La partie supérieure de la cellule de greffage peut être maintenue au niveau de la plaque, par exemple en plaçant un morceau de tampon dentaire humidifié avec $500 \mu\text{L}$ de la solution stérilisante additionnée de 15 % en poids/volume de glycérol au fond des puits (graphique 1).



Graphique 1 : cellule larvaire dans un puits de culture tissulaire.

9. Ces plaques sont placées dans un dessiccateur hermétique en plexiglas (par exemple NALGENE 5314-0120 ou 5317-0180 en fonction du volume nécessaire) avec une coupelle remplie d'une solution saturée de sulfate de potassium (K_2SO_4) afin de maintenir une atmosphère saturée d'eau. Le dessiccateur est placé dans un incubateur équipé d'un système de circulation d'air forcée à $34-35 \text{ }^\circ\text{C}$ afin d'homogénéiser la température autour du dessiccateur, cette température devant rester la plus stable possible pendant toute la durée de l'essai.

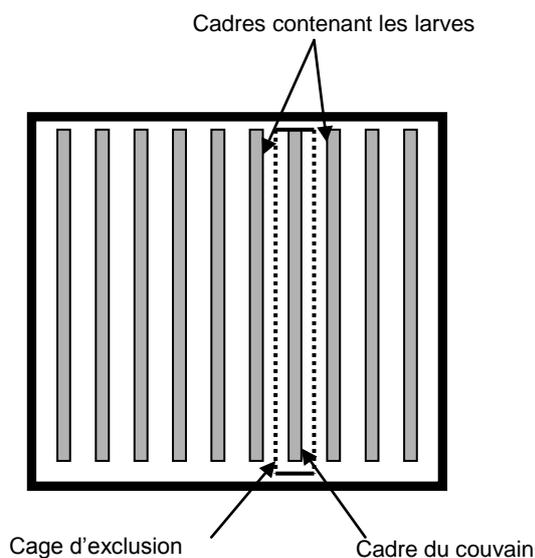
Organismes d'essai

Origine des larves

10. Les larves sont recueillies à partir de trois colonies différentes, chacune représentant un réplicat (voir paragraphe 19). Les colonies doivent être convenablement nourries, en bonne santé (c'est-à-dire autant que possible exemptes de maladies et de parasites), leur historique et leur état physiologique étant connus.

11. Les essais sont effectués pendant la période de ponte de la reine. En cas de traitement sanitaire (contre les acariens ou les maladies, par exemple), la date d'application du traitement à la colonie et l'identité du produit sont consignées. Aucun traitement n'est autorisé dans les quatre semaines précédant le début de l'essai.

12. À J-3 (graphique 3), afin d'assurer la production de larves de trois colonies, les reines d'au minimum trois colonies sont confinées dans leur propre colonie dans une cage d'exclusion contenant un cadre vide ou un cadre contenant un couvain d'ouvrières émergentes et des cellules vides (graphique 2). La cage d'exclusion est placée à proximité de cadres contenant du couvain. À J-2, au plus tard 30 heures après l'encagement, la reine est libérée de la cage, après vérification de la présence d'œufs fraîchement pondus. En fonction de la fertilité de la reine, il est recommandé de réduire le temps d'isolement, afin de minimiser la variabilité de la taille et de l'âge entre les larves. Le cadre contenant les œufs est laissé dans la cage, à proximité du couvain, au cours de l'étape d'incubation et jusqu'à l'éclosion (J1).



Graphique 2 : Coupe transversale d'une ruche contenant la cage d'exclusion

Préparation du matériel d'élevage

Alimentation des larves

13. L'alimentation se compose des trois régimes suivants, adaptés aux besoins des larves à leurs différents stades de développement :

- Régime A (J1) : 50 % en poids de gelée royale fraîche + 50 % en poids d'une solution aqueuse contenant 2 % en poids d'extrait de levure, 12 % en poids de glucose et 12 % en poids de fructose.
- Régime B (J3) : 50 % en poids de gelée royale fraîche + 50 % en poids d'une solution aqueuse contenant 3 % en poids d'extrait de levure, 15 % en poids de glucose et 15 % en poids de fructose.
- Régime C (de J4 à J6) : 50 % en poids de gelée royale fraîche + 50 % en poids d'une solution aqueuse contenant 4 % en poids d'extrait de levure, 18 % en poids de glucose et 18 % en poids de fructose.

14. S'il reste des agrégats dans les solutions de sucre, ceux-ci doivent être complètement dissous avant le mélange avec la gelée royale. Une « gelée royale fraîche » est une gelée royale recueillie au cours des 12 mois précédents ; il est possible de la diviser en aliquotes de 5 g afin d'éviter de décongeler l'ensemble du lot pour chaque essai, et de la stocker dans un congélateur à ≤ -10 °C. Des gelées royales du commerce sont acceptables s'il peut être démontré que leurs performances sont comparables aux données historiques obtenues dans l'installation d'essai, par exemple que la mortalité ne dépasse pas 15 % au cours de la période larvaire. Il est recommandé de procéder à une analyse multi-résiduelle de chaque lot de gelée royale afin de vérifier l'absence de contaminants (principalement antibiotiques et insecticides).

15. Les régimes alimentaires, fraîchement préparés avant chaque essai, sont stockés dans un réfrigérateur à $\leq +5$ °C (mais pas congelés) pendant toute la durée de l'essai. Ils peuvent être préparés à l'avance pour ensuite être stockés congelés jusqu'à leur utilisation.

Solutions d'essai

16. Le produit chimique testé est normalement dissous dans de l'eau osmosée. Pour des produits chimiques difficilement solubles, un solvant, de préférence l'acétone, peut être utilisé pour préparer la solution-mère. Dans ce cas, un solvant témoin avec un régime alimentaire additionné du même volume de solvant est testé en plus de la nourriture habituelle témoin. Le volume de solvant organique, le cas échéant, doit être maintenu aussi bas que possible, et dans le cas de l'acétone, il ne doit pas excéder 5% du volume final d'aliment au jour J4 (jour de l'exposition au produit chimique).

17. La dilution des solutions-mères de la série de cinq solutions d'essai est réalisée de préférence avec de l'eau osmosée, ou un solvant pour les produits chimiques faiblement solubles, de préférence juste avant l'administration aux larves, à l'aide d'embouts de pipettes à usage unique équipés d'un filtre. Les volumes de solution d'essai dans l'alimentation ne doivent pas dépasser 10 % du volume final de l'aliment (soit 3 μ L de solution d'essai pour un volume de nourriture de 30 μ L à J4) ou 5% si l'acétone est nécessaire (p.ex. 1.5 μ L de solution d'essai pour un volume d'aliment de 30 μ L au jour J4).

18. Des échantillons de la solution-mère seront stockés dans un congélateur à ≤ -10 °C afin d'être vérifiés en vue de la détermination analytique de la concentration du produit chimique testé.

MODE OPERATOIRE

Conditions d'exposition

19. La cellule individuelle contenant une larve est l'unité expérimentale. Au minimum douze larves de chacune des trois colonies sont placées sur une même plaque pour chaque niveau de traitement ainsi que

pour le(s) témoins(s) et pour la substance toxique de référence. Pour chaque essai, les traitements et le(s) témoin(s) suivants sont utilisés :

- témoin sans solvant (minimum 12 larves × 3 colonies = 36 larves minimum) ;
- témoin avec solvant si nécessaire (minimum 12 larves × 3 colonies = 36 larves minimum) ;
- cinq traitements, soit 5 concentrations croissantes à tester (contenant chacune un minimum de 12 larves × 3 colonies = 36 larves minimum par traitement) formant une série géométrique dont le facteur d'espace n'excède pas 3, et qui englobe la DL_{50} ; ou bien, quand un essai limite est effectué (voir paragraphe 23), une dose unique de 100 µg m.a. (ou de produit chimique)/larve ou telle que la solubilité maximale soit atteinte (si elle est inférieure), peut être testée ;
- substance toxique de référence, diméthoate à 8.8 µg/larve (minimum 12 larves × 3 colonies = 36 larves minimum).

20. Un total de sept à huit (si un solvant est utilisé) plaques sont utilisées par test. Chaque groupe d'un minimum de 12 larves provenant de chacune des trois colonies est considéré comme un réplicat pour un niveau donné de traitement et identifié comme tel sur la microplaque.

21. Les plaques sont maintenues dans l'obscurité pendant toute la durée de l'essai. Pendant l'essai, la température dans l'incubateur est maintenue entre 34 et 35 °C. Toutefois, des écarts sont tolérés, mais la température ne doit ni descendre en dessous de 23 °C ni dépasser 40 °C, et ces écarts ne doivent pas durer plus de 15 minutes ni se produire plus d'une fois par 24 heures.

Essai préliminaire de détermination des concentrations

22. Afin d'évaluer l'ordre de grandeur adéquat de la DL_{50} , il est recommandé d'exécuter une expérience préliminaire dans laquelle les doses de la substance d'essai varient en une progression géométrique de 5 à 10.

Essai limite

23. Dans certains cas (par exemple lorsqu'on s'attend à ce qu'une substance d'essai soit peu toxique ou lorsqu'un produit chimique est peu soluble), un essai limite peut être effectué en utilisant soit 100 µg m.a. (ou de produit chimique)/larve, soit la solubilité maximale réalisable pour les produits chimiques peu solubles (si elle est inférieure), afin de démontrer que la DL_{50} est supérieure à cette valeur. Trois réplicats d'un minimum de douze larves provenant de trois colonies différentes sont utilisés pour la dose limite testée, ainsi que le(s) témoin(s) correspondant (s), et l'utilisation de la substance chimique de référence. Si une mortalité statistiquement significative se produit par rapport à la mortalité des témoins, une étude complète devra être menée.

Recueil des larves

24. A J1, le cadre contenant des larves au premier stade larvaire (graphique 3) est transféré de la ruche au laboratoire dans un récipient isolé afin d'éviter les variations de température, puis maintenu à la température ambiante (ne baissant pas au-dessous de 20°C). Il est ensuite introduit dans une hotte à flux laminaire ou un autre environnement propre, pour le greffage. Afin d'éviter les biais dus à l'hétérogénéité possible des larves, il est fortement recommandé de choisir des larves nouvellement écloses qui ne sont pas encore en forme de « C », et de répartir de manière aléatoire les larves dans les plaques pour chaque

colonie. Un minimum de douze larves provenant de chacune des trois colonies de réplicats est nécessaire à J4, jour de l'administration du traitement chimique ; l'essai peut donc être lancé à J1 avec un nombre supérieur de larves de chaque colonie.

25. Cette répartition aléatoire des larves peut également se faire à J4, juste avant l'administration du traitement chimique.

Greffage et alimentation des larves

26. La nourriture est réchauffée dans l'incubateur avant utilisation. Le greffage est effectué de préférence sur une plaque chauffante maintenue à une température de 34 à 35 °C, mais en aucun cas au-delà de 35°C. Les micropipettes utilisées pour dispenser la nourriture dans les cellules sont dotées d'embouts à usage unique. Au jour 1 (J1), 20 µL du régime A sont déposés dans chaque cellule, et une larve est délicatement prélevée du cadre et transférée dans chaque cellule, à la surface de la nourriture, à l'aide d'un outil de greffage ou d'un pinceau mouillé (N 3/0 par exemple). Lorsqu'une plaque est remplie par un minimum de 12 larves de chaque colonie, elle est placée en une seule couche dans le récipient hermétique, qui a été préalablement placé dans un incubateur ventilé à 34 à 35 °C (voir photo 1), cette température devant rester la plus stable possible pendant toute la durée de l'essai.

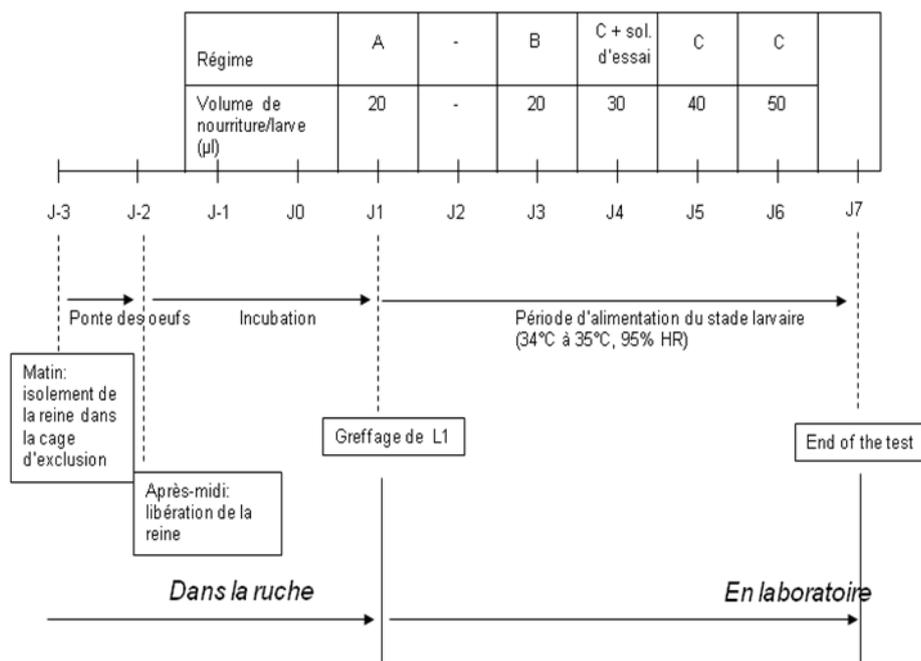


Photo 1 : Dispositif d'incubation des larves

27. Toutes les larves sont nourries une fois par jour (sauf à J2), de préférence sur une plaque chauffante dont la température ne doit pas dépasser 35 °C, à l'aide d'un embout de pipette transparent stérilisé suivant le calendrier présenté au graphique 3, le volume de l'alimentation fournie à chaque larve étant notamment ajusté quotidiennement. Des précautions doivent être prises pour éviter de toucher et de noyer les larves lors de leur alimentation. La nourriture est déposée à côté de la larve, le long de la paroi de la cellule de greffage. La nourriture doit être déposée dans la cellule même si la ration précédente n'a pas été totalement consommée. La présence d'aliments non consommés à la fin de l'essai doit être signalée.

Administration unique de la substance chimique dans la solution d'essai

28. A J4, un minimum de douze larves bien nourries provenant de chacune des trois colonies sont sélectionnées et traitées avec 30 µL du régime C contenant la solution d'essai à la concentration appropriée. Le mélange de la solution d'essai avec la nourriture est effectué juste avant l'administration à J4, sauf si la stabilité du produit chimique testé dans la nourriture a été démontrée et documentée. A J4, chaque traitement (contenant la nourriture) est administré au moyen d'un embout de micropipette différent de manière à éviter toute contamination.



Graphique 3 : Représentation schématique des étapes importantes de l'essai de toxicité larvaire (J = jour).

Fin de l'essai

29. À J7, les larves mortes sont comptées et les plaques sont congelées à $\leq -10^{\circ}\text{C}$ afin de mettre fin à l'essai.

Observations

30. Suite à l'exposition au produit chimique à J4, la mortalité est vérifiée et consignée lors de l'administration de la nourriture à J5 et J6 ainsi qu'à la fin de l'essai à J7. Une larve immobile ou qui ne réagit pas au contact de l'outil de greffage ou du pinceau est notée comme morte.

31. Lors de l'administration de la nourriture, les larves mortes sont systématiquement supprimées pour des raisons sanitaires.

32. D'autres observations doivent être consignées afin d'aider à l'interprétation de la mortalité. La présence de restes de nourriture à J7 doit être (qualitativement) signalée.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données et analyse statistique

Calcul de la DL₅₀

33. La mortalité est exprimée en pourcentage de la population initiale après un ajustement selon la formule d'Abbott (11) :

$$M = \frac{(P - T)}{S} \times 100 \quad \text{mortalité brute}$$

$$M = \frac{(\%P - \%T)}{100 - \%T} \times 100 \quad \text{mortalité en pourcentage}$$

M : taux de mortalité ajusté exprimé en pourcentage de la population initiale, c'est à dire du nombre initial de larves

P : nombre de larves mortes dans le groupe traité

T : nombre de larves mortes dans le groupe témoin

S : nombre de larves survivantes dans le groupe témoin

%P : pourcentage de mortalité due au traitement

%T : pourcentage de mortalité des témoins

34. Les données sont résumées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque groupe de traitement, ainsi que pour les groupes témoins et ceux ayant reçu le produit chimique de référence, le nombre de larves utilisées, la mortalité à J5, J6 et J7 (soit respectivement 24 h, 48 h et 72 h après l'administration du traitement chimique). Les données de mortalité seront analysées par les méthodes statistiques appropriées (par exemple, analyse des probits, moyenne mobile, probabilité binomiale) (8) (9). On trace les courbes dose-effet pour chaque moment d'observation recommandé (soit 24 h, 48 h et 72 h après l'administration de la substance) et on calcule la pente des courbes et la dose létale médiane (DL₅₀) avec un intervalle de confiance de 95 %. La DL₅₀ doit être exprimée en µg de la substance d'essai par larve.

Rapport d'essai

35. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produit chimique testé :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- données relatives à l'identification chimique, dont la pureté.

Espèce testée :

- provenance, espèce et sous-espèce d'abeille domestique, fournisseur (s'il est connu) et conditions de culture utilisées ;
- état de santé de la ruche utilisée dans l'essai.

Conditions de l'essai :

- lieu et date de l'essai ;
- description du système d'essai : type de plaques utilisées, nombre de larves et de témoins par niveau de traitement, solvants utilisés et (le cas échéant) leurs concentrations, concentrations utilisées pour la substance chimique d'essai ;
- conditions d'incubation : température (valeur moyenne, écart-type, minimum et maximum) et humidité relative.

Résultats :

- nombre et pourcentage de larves considérées comme mortes pour chaque niveau de traitement, le(s) témoin(s) et la substance chimique toxique de référence (diméthoate) ;
- concentrations d'essai nominales utilisées et concentration mesurée dans la solution mère. La concentration mesurée ne doit pas dépasser 20 % de la valeur nominale ;
- mortalité à J5, J6 et J7, et DL₅₀ à 72 h totale à J7 avec un intervalle de confiance de 95 % et représentation graphique du modèle ajusté, pente de la courbe concentration-réponse et erreur-type ; procédures statistiques/mathématiques utilisées pour la détermination de la DL₅₀ ;
- autres observations, y compris la présence d'aliments non consommés à la fin de l'essai ;
- justification de tout écart par rapport à la Ligne directrice et conséquences éventuelles de ces écarts sur les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Aupinel, P., D., Fortini, H., Dufour, J. N. Tasei, B. Michaud, J. F. Odoux et M. H. Pham-Delegue, (2005), Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58, pp. 107-111.
- (2) Aupinel, P., D., Fortini, F. Marolleau, J. N. Tasei, B. Michaud et J. F. Odoux (2007), Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. Article présenté au 9^e International Symposium of the ICP-BR-Bee-Protection-Group, 12-14 octobre 2007, York, Angleterre.
- (3) Aupinel, P., P. Medrzycki, D. Fortini, B. Michaud, J.N. Tasei et J.F. Odoux (2007), A new larval in vitro rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia*, 90, pp. 91-94.
- (4) Aupinel, P., D. Fortini, D. Michaud, P. Medrzycki, E. Padovani, D. Przygoda, C. Maus, J.D. Charriere, V. Kilchenmann, U. Riessberger-Galle, J.J. Vollmann, L. Jeker, M. Janke, J.F. Odoux et J.N. Tasei (2009), Honey bee brood ring-test : method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. *Julius-Kühn-Archiv*, 423, pp. 96-102.
- (5) United States Environmental Protection Agency (US EPA), Interim Guidance on Honey Bee Data Requirements (2011), disponible à l'adresse : http://www.epa.gov/pesticides/science/efed/policy_guidance/team_authors/terrestrial_biology_tech_team/honeybee_data_interim_guidance.pdf

- (6) Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), Draft Guidance on the Risk Assessment of Plant Protection Products on bees (2012), disponible (en anglais seulement) à l'adresse : <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/120920.pdf>
- (7) Alix, A. et G. Lewis (2010), Guidance for the assessment of risks to bees from the use of plant protection products under the framework of Council Directive 91/414 and Regulation 1107/2009. *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 40, pp. 196–203
- (8) OCDE (1998), Lignes directrices pour les essais de produits chimiques / Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 214 : Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par contact, OCDE, Paris, DOI : <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070196-fr>
- (9) OCDE (1998), Lignes directrices pour les essais de produits chimiques / Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Essai n° 214 : Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par contact, OCDE, Paris, DOI : 10.1787/20745826
- (10) OCDE (1998), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations, n° 23, OCDE, Paris.
- (11) Abbott, W.S.(1925), A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Jour. Econ. Entomol.*, 18, pp. 265-267.