

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

Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par voie orale

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité aiguë par voie orale 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 voie orale pour les abeilles domestiques, par exemple lorsque des abeilles risquent d'être exposées à cette substance. L'essai de toxicité aiguë par voie orale 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 dispersée dans une solution de saccharose. Elles reçoivent ensuite la même alimentation, mais sans la substance d'essai. La mortalité est notée quotidiennement durant au moins 48 heures et comparée aux valeurs des témoins. Si le taux de mortalité augmente entre 24 heures et 48 heures, tandis que la mortalité des témoins demeure à un niveau acceptable, c'est-à-dire ≤ 10 pour cent, il convient d'allonger la durée de l'essai jusqu'à 96 heures au maximum. On analyse les résultats

afin de calculer la DL_{50} à 24 heures et à 48 heures (voir définitions à l'annexe) et, si 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, on peut faire éclore les abeilles dans une étuve et elles 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 produits 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). Les abeilles sont nourries avec 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). Après que les doses d'essai ont été administrées, l'alimentation doit être fournie ad libitum. Le système d'alimentation doit permettre l'enregistrement de la prise de nourriture dans chaque cage (voir paragraphe 17). Un tube de verre (de quelque 50 mm de long et 10 mm de large, dont le diamètre de l'extrémité ouverte est rétréci à environ 2 mm) peut être utilisé.

Préparation des abeilles

10. Les abeilles récoltées sont réparties au hasard dans les cages d'essai qui, elles-mêmes, sont disposées au hasard dans la salle d'expérience. Les abeilles peuvent être privées de nourriture pendant une durée maximale de 2 heures avant le début de l'essai. On recommande de faire jeûner les abeilles avant le traitement pour que le niveau de remplissage de leur tube digestif soit identique au début de l'essai. Les abeilles moribondes doivent être retirées et remplacées par des abeilles saines avant le début de l'essai.

Préparation des doses

11. Si la substance d'essai est miscible dans l'eau, elle peut être dispersée directement dans une solution de saccharose à 50 pour cent. Pour les produits de qualité technique et les substances peu solubles dans l'eau, des véhicules tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants peu toxiques pour les abeilles peuvent être utilisés (par exemple de l'acétone, du diméthylformamide, du diméthylsulfoxyde). La concentration du véhicule dépend de la solubilité de la substance d'essai et devrait être identique pour toutes les concentrations testées. Cependant, il convient généralement d'appliquer une concentration de 1 pour cent pour le véhicule et de ne pas la dépasser.

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 : une solution aqueuse et une solution de saccharose renfermant le solvant ou le véhicule à la même concentration que dans les solutions d'essai.

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 facteur de dilution et le nombre de concentrations du traitement doivent être déterminés 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 concentrations appropriées pour le dosage.

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

15. Un minimum de trois groupes témoins, comportant chacun 10 abeilles, devraient être testés parallèlement aux groupes traités. Des séries de témoins devraient également être incluses pour les solvants ou les véhicules utilisés (voir paragraphe 12).

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 voie orale après 24 heures se situe entre 0,10 et 0,35 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. Il faudrait fournir à chaque groupe d'abeilles testé 100 à 200 µl d'une solution aqueuse de saccharose à 50 pour cent contenant la substance d'essai à la concentration appropriée. Il est nécessaire d'administrer un volume plus grand dans le cas des produits peu solubles, peu toxiques ou peu concentrés dans la préparation, étant donné qu'il faut utiliser des proportions plus élevées dans la solution de saccharose. La quantité de nourriture traitée consommée par groupe devrait être surveillée. Une fois consommé (généralement en 3 à 4 heures), le tube contenant la solution alimentaire traitée devrait être retiré de la cage et remplacé par une solution de saccharose pure. Les solutions de saccharose sont ensuite fournies ad libitum. Pour certains composés, la nourriture traitée avec des concentrations élevées peut être rejetée par les abeilles, si bien que la quantité de nourriture consommée risque d'être faible ou nulle. Après 6 heures au maximum, la nourriture traitée non consommée doit être remplacée par une solution de saccharose pure. La quantité de nourriture traitée consommée doit être évaluée (par exemple, en mesurant le volume ou le poids de la nourriture traitée restante).

Conditions d'essai

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

Durée

19. L'essai dure 48 heures après que la solution d'essai a été remplacée par une solution de saccharose pure. Si la mortalité continue de s'accroître de plus de 10 pour cent après les premières 24 heures, la durée de l'essai doit être prolongée jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins n'excède pas 10 pour cent.

Observations

20. La mortalité est relevée 4 heures après le début de l'essai et ensuite 24 heures et 48 heures après que la dose a été administrée. Si une période d'observation prolongée est requise, d'autres évaluations devront être pratiquées à des intervalles de 24 heures jusqu'à 96 heures au maximum, à condition que la mortalité des témoins ne dépasse pas 10 pour cent.

21. La quantité de solution alimentaire consommée par groupe devrait être estimée. La comparaison entre les taux de consommation des solutions traitées et non traitées en l'espace de six heures peut donner une idée des qualités organoleptiques de la nourriture traitée.

22. Tous les effets se traduisant par des anomalies du comportement pendant la période d'essai doivent être notés.

ESSAI LIMITE

23. 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, l'évaluation de la quantité de nourriture traitée consommée 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 22), il faut les noter.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

24. 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 des 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). Lorsque la nourriture traitée n'est pas complètement consommée, la dose de la substance d'essai consommée par groupe doit être déterminée. La DL_{50} doit être exprimée en µg de la substance d'essai par abeille.

Rapport d'essai

25. 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 relatives à l'identification chimique, notamment la formule structurale, la pureté (dans le cas des pesticides, l'identité et la concentration du ou des ingrédient(s) actif(s)).

Espèce testée :

- nom scientifique, race, âge approximatif (en semaines), méthode et date de collecte ;
- informations 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, notamment le type, la dimension et le matériau des cages ;
- méthodes de préparation des solutions mères et des solutions d'essai (le solvant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant) ;
- 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 dose 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 appliquées pour calculer la DL_{50} ;
- mortalité chez les témoins ;
- autres effets biologiques observés ou mesurés, par exemple un comportement anormal des abeilles (y compris un rejet de la dose d'essai), la vitesse de consommation de la nourriture dans les groupes traités et non traités ;
- 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 IUBBS, 14pp + 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. and 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 voie orale : effets nocifs se produisant dans un délai maximal de 96 heures après l'administration d'une dose unique de la substance d'essai par voie orale.

Dose : quantité de substance d'essai consommée. La dose est exprimée en masse (μg) de substance d'essai par animal testé ($\mu\text{g}/\text{abeille}$). La dose réellement consommée par chaque abeille ne peut être calculée, étant donné que les abeilles sont nourries collectivement, mais il est possible d'estimer une dose moyenne (quantité totale de substance d'essai consommée/nombre d'abeilles testées par cage).

DL₅₀ (dose létale 50%) orale : 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 voie orale. La DL₅₀ s'exprime en μg de substance d'essai par abeille. Pour les pesticides, la substance d'essai peut être soit un ingrédient actif, soit une préparation chimique contenant un ou plusieurs ingrédients actifs.

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