

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

« Oiseaux, Essai de Reproduction »**1. INTRODUCTION**• Connaissances requises

- Solubilité dans l'eau
- Pression de vapeur
- CL 50 de toxicité liée au régime alimentaire (voir Ligne directrice 205)

• Informations générales

- Formule de structure
- Pureté de la substance d'essai
- Coefficient de partage n-octanol/eau
- Méthodes d'analyse pour déterminer la concentration de la substance d'essai dans la nourriture
- Stabilité chimique dans l'eau, à la lumière et dans la nourriture
- Résultats d'un essai de biodégradabilité dite « facile » (voir Ligne directrice 301)

• Réserves

- Cette Ligne directrice ne peut être utilisée pour les substances très volatiles ou instables.
- La substance d'essai doit posséder des caractéristiques qui permettent de la mélanger uniformément dans la nourriture. Pour assurer un mélange uniforme, on peut employer un véhicule de faible toxicité pour les oiseaux.

• Documents de référence

Voir les références (1) et (2) du chapitre 4, Bibliographie.

2. M É T H O D E

A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE, APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI

- D é f i n i t i o n s

La CSEO (Concentration sans effet observé) est la concentration correspondant au niveau de dose le plus élevé administré dans un essai à laquelle aucun effet néfaste ne survient.

Le régime de base est la ration d'élevage (pour les adultes) ou la ration de départ (pour les jeunes oiseaux) convenant à l'espèce étudiée et qui répond aux besoins nutritionnels des oiseaux.

Les incubés comprennent les œufs qui sont mis en incubation, c'est-à-dire l'ensemble des œufs produits à l'exception de ceux qui présentent des fêlures et de ceux qui ont été retirés pour la mesure de l'épaisseur de la coquille.

- S u b s t a n c e s d e r é f é r e n c e

Aucune substance de référence n'est recommandée pour cet essai.

- P r i n c i p e d e l a m é t h o d e

Les oiseaux reçoivent de la nourriture qui contient la substance d'essai à différentes concentrations pendant une période d'au moins 20 semaines. On amène les oiseaux à pondre des œufs par manipulation de la photopériode. Les œufs sont recueillis pendant une période de 10 semaines, on les fait artificiellement incuber et éclore, et on élève les jeunes pendant 14 jours. On compare la mortalité des adultes, la production d'œufs, le nombre d'œufs fêlés, l'épaisseur de la coquille, la viabilité, l'éclosabilité et les effets sur les jeunes oiseaux avec les paramètres correspondants dans le groupe témoin.

- C o n d i t i o n s d e v a l i d i t é d e l' e s s a i

– La mortalité dans le groupe témoin ne doit pas dépasser 10 pour cent à la fin de l'essai.

« Oiseaux, Essai de Reproduction »

- Le nombre moyen de poussins survivants de 14 jours par femelle dans le groupe témoin, doit être d'au moins 14 pour le canard colvert, 12 pour le colin de Virginie et 24 pour la caille des blés.
- L'épaisseur moyenne de la coquille dans le groupe témoin doit être respectivement d'au moins 0,34, 0,19 et 0,19 mm pour le colvert, le colin et la caille.
- Si on respecte le programme recommandé de concentrations et qu'on ne détecte pas d'effet sur la reproduction, on peut mentionner que la CSEO est supérieure à la concentration la plus élevée mise en œuvre.
- On doit démontrer que la concentration de la substance d'essai a été maintenue de façon satisfaisante dans la nourriture (à plus de 80 pour cent de la concentration nominale) tout au long de la période d'essai.

B. MODE OPÉRATOIRE**• Préparations**

Il est nécessaire de disposer d'installations adéquates pour l'élevage des oiseaux, de préférence en local clos. Cela comprend une bonne régulation de la ventilation, de la température, de l'humidité et de l'éclairage, en tant que de besoin. L'éclairage artificiel doit être proche du spectre visible de la lumière du jour et contrôlé de façon automatique. Une période de transition de 15 à 30 minutes à l'aurore et au crépuscule est recommandée.

Les oiseaux sont répartis au hasard dans les groupes d'essai et les groupes témoins. Les oiseaux d'essai et les témoins doivent être acclimatés aux installations et au régime de base pendant au moins deux semaines. Les oiseaux qui ne se supportent pas doivent être changés de cage pendant la première semaine d'acclimatation.

Une population d'oiseaux ne doit pas être utilisée si plus de trois pour cent des animaux de l'un ou l'autre sexe meurent ou s'affaiblissent au cours de la période d'acclimatation.

Équipement

L'équipement suivant est nécessaire :

- des cages acceptables, propres et de capacité suffisante pour la reproduction des oiseaux et pour l'élevage des jeunes. On doit utiliser une litière propre. Les éleveurs pour les jeunes oiseaux doivent avoir un système de régulation de la température
- des incubateurs et des éclosiers artificiels acceptables, de préférence avec une régulation automatique de la température et de l'humidité et avec un dispositif pour retourner les œufs
- un équipement acceptable pour conserver les œufs à température et humidité constantes.

- Animaux d'expérience

Choix des espèces

Pour cet essai, on peut utiliser une ou plusieurs espèces. L'espèce doit être choisie en fonction des objectifs pour lesquels l'essai est réalisé. Les espèces recommandées sont le canard colvert (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*), le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) et la caille des blés japonaise (*Coturnix coturnix japonica*).

Les espèces recommandées sont faciles à élever et sont largement disponibles. Si d'autres espèces sont utilisées il faut en donner la justification dans le rapport. Les oiseaux peuvent être achetés ou élevés en laboratoire. Les oiseaux achetés doivent être reconnus exempts de maladies et on doit les examiner pour s'assurer qu'ils ne sont pas blessés. Tous les oiseaux d'essai et témoins doivent appartenir à la même population d'origine connue. Les canards colverts et les colins de Virginie utilisés dans les essais doivent avoir un aspect similaire à celui des oiseaux sauvages de ces espèces.

Conditions d'encagement et d'alimentation

Les oiseaux adultes doivent être maintenus dans les conditions suivantes : bonne ventilation, température de $22 \pm 5^\circ\text{C}$ et humidité relative de 50 à 75 pour cent. Le Tableau 1 donne des conditions supplémentaires propres aux différentes espèces.

« Oiseaux, Essai de Reproduction »

TABLEAU 1 : Conditions recommandées pour les oiseaux adultes

Espèce de l'essai	Age au début des âges	Intervalle de la cage dans un essai	Surface au sol par paire*
Colvert	9-12 mois	± 2 semaines	1 m ²
Colin	20-24 semaines	± 1 semaine	0,25 m ²
Caille	**	± 1/2 semaine	0,15 m ²

Les conditions de milieu ambiant sont les mêmes pour la période d'acclimatation et pour la période d'essai, sauf que durant la première période, l'on ne donne pas de substance d'essai dans la nourriture. L'utilisation de produits chimiques ou de médicaments doit être évitée dans la mesure du possible, et quand on y recourt, il faut le signaler.

On doit éviter toute perturbation qui pourrait altérer le comportement des oiseaux.

Les conditions de milieu ambiant pour les œufs et les jeunes oiseaux sont données dans le Tableau 2.

Les températures et les taux d'humidité indiqués se rapportent à des incubateurs et à des éclosiers à ventilation forcée. Dans les incubateurs et les éclosiers à ventilation naturelle sans courant d'air, les températures doivent être plus élevées de 1,5 à 2°C et l'humidité relative doit être augmentée d'environ 10 pour cent. En hauteur, une plus forte humidité relative est nécessaire. Dans les élevoirs, les températures doivent être mesurées entre 2,5 et 4 cm au-dessus du plancher de la cage.

* Si des groupes plus grands sont utilisés la surface doit être augmentée en proportion.

** Il est recommandé de s'assurer que les cailles sont de bons reproducteurs avant de les utiliser dans l'essai, afin de réduire la variabilité pour cette espèce.

TABLEAU 2 : Conditions recommandées pour les œufs et pour les jeunes oiseaux

	Température (°C)	Humidité relative (pour cent)	Retournement
Colvert			
stockage	14 - 16	60 - 85	facultatif
incubation	37,5	60 - 75	oui
éclosion	37,5	75 - 85	non
jeunes, 1 ^{ère} semaine	32 - 35	60 - 85	-
jeunes, 2 ^{ème} semaine	28 - 32	60 - 85	-
Colin			
stockage	15 - 16	55 - 75	facultatif
incubation	37,5	50 - 65	oui
éclosion	37,5	70 - 75	non
jeunes, 1 ^{ère} semaine	35 - 38	50 - 75	-
jeunes, 2 ^{ème} semaine	30 - 32	50 - 75	-
Caille			
stockage	15 - 16	55 - 75	facultatif
incubation	37,5	50 - 70	oui
éclosion	37,5	70 - 75	non
jeunes, 1 ^{ère} semaine	35 - 38	50 - 75	-
jeunes, 2 ^{ème} semaine	30 - 32	50 - 75	-

• Conditions expérimentales

Aliments contenant les substances d'essai

Au moins trois concentrations différentes de la substance d'essai dans la nourriture sont nécessaires pour l'essai. Les concentrations à utiliser doivent être déduites des résultats d'un essai de CL 50 dans l'alimentation (voir Ligne directrice 205).

Les concentrations les plus élevées doivent être voisines de la moitié de la CL 10. Les concentrations inférieures doivent être des fractions de la dose la plus élevée, espacées de façon géométrique (par exemple 1/6 et 1/36 de la dose la plus élevée). La concentration d'essai maximale recommandée est de 1000 ppm.

« Oiseaux, Essai de Reproduction »

On prépare les aliments contenant les quantités requises de la substance d'essai en mélangeant de façon uniforme la quantité appropriée de la substance d'essai au régime de base pour les oiseaux reproducteurs adultes. La distribution uniforme de la substance d'essai dans la nourriture constitue le critère permettant de choisir la méthode de mélange. Pour assurer une distribution uniforme, on utilise souvent un véhicule de faible toxicité pour les oiseaux. Les véhicules ne doivent pas être présents à plus de 2 pour cent en poids de la nourriture. Si l'on utilise un véhicule pour les oiseaux d'essai, le même véhicule doit être ajouté à la nourriture des oiseaux du groupe témoin. Sont acceptable l'eau, l'huile de maïs ou d'autres véhicules pour lesquels il existe des preuves bien documentées qu'ils n'interfèrent pas avec la toxicité des substances d'essai. Il faut une justification expérimentale dans le cas où on utilise des véhicules pour lesquels des preuves bien documentées de non-interférence n'existent pas. La nourriture des jeunes oiseaux ne doit pas contenir de substance d'essai et par conséquent pas de véhicule.

- Exécution de l'essai

Les oiseaux sont répartis dans les cages de la façon suivante : soit un couple, soit un mâle et deux femelles (colin et caille), soit un mâle et trois femelles (colvert). D'autres arrangements ne sont pas exclus s'ils sont justifiés. Les oiseaux témoins et les oiseaux traités sont maintenus dans les mêmes conditions expérimentales. Dans les essais réalisés sur des couples, on doit utiliser au moins douze cages d'oiseaux pour chaque concentration d'essai et pour le groupe témoin. Dans les essais réalisés sur des groupes de trois ou quatre oiseaux, on doit utiliser au moins huit cages de colverts et douze cages de colins ou de cailles pour chaque concentration d'essai et pour le groupe témoin.

L'essai commence quand on soumet les oiseaux d'essai à un régime alimentaire contenant la substance d'essai. L'exposition des oiseaux adultes à la substance étudiée doit être continue tout au long de l'essai. On ne doit pas ajouter de substance d'essai (et par conséquent pas de véhicule) à la nourriture des jeunes oiseaux engendrés au cours de l'essai. De l'eau propre doit être disponible à volonté.

Si l'essai est réalisé dans l'environnement artificiel d'un local clos, ce qui est préférable, les oiseaux doivent être maintenus dans des conditions correspondant à des journées courtes (sept à huit heures d'éclairage par jour) pendant huit semaines après le début de l'essai. Durant ce temps, la période d'obscurité ne doit pas être interrompue. La photopériode est ensuite allongée pour atteindre 16 à 18 heures d'éclairage par jour, afin de mettre les oiseaux dans des conditions propres à la reproduction. La ponte doit débiter deux à quatre semaines après que la photopériode a été allongée.

Si l'essai est réalisé à l'extérieur, son calendrier doit correspondre à la saison de reproduction naturelle de l'espèce sur les lieux de l'essai. On doit soumettre les oiseaux à un régime alimentaire contenant la substance d'essai pendant au moins 10 semaines avant le début normal de la ponte.

Dans l'un comme dans l'autre environnement, l'essai doit être poursuivi pendant au moins huit semaines, et de préférence dix semaines, après le début de la ponte.

La concentration de la substance d'essai dans la nourriture après la première semaine de l'essai ne doit pas descendre en dessous de 80 pour cent de la concentration prévue. A moins que la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture puisse être établie de façon satisfaisante, les aliments qui contiennent les concentrations les plus élevées et les plus faibles doivent, au cours de la première semaine de l'essai, être analysés immédiatement après la réalisation initiale du mélange et de nouveau dans les quatre heures qui précèdent le remplacement par de la nourriture fraîchement mélangée. Si toutes les analyses donnent un résultat qui se situe au-dessus de 80 pour cent de la concentration prévue, aucune autre analyse n'est nécessaire et la nourriture d'essai doit être renouvelée suffisamment souvent pour assurer le maintien des concentrations.

« Oiseaux, Essai de Reproduction »

Si l'une ou l'autre des séries d'analyses indique que les concentrations sont inférieures à 80 pour cent de la concentration prévue, des ajustements doivent être apportés afin d'augmenter les concentrations initiales ou de maintenir les concentrations réelles par des renouvellements plus fréquents. Des analyses supplémentaires doivent être effectuées au cours de la deuxième semaine de l'essai afin de s'assurer que les ajustements ont permis d'atteindre l'objectif des 80 pour cent.

Quelle que soit la stabilité de la substance d'essai dans la nourriture, celle-ci doit être renouvelée au moins une fois par semaine. Si une substance n'est stable que pendant une durée telle que la nourriture devrait être renouvelée tous les jours, l'essai peut se révéler inapproprié.

Quand la ponte a commencé, les œufs doivent être recueillis tous les jours et marqués selon la cage dont ils proviennent. Les œufs doivent être stockés et mis à incuber une fois par semaine ou tous les 15 jours (voir le Tableau 2 pour les conditions). Avant incubation, tous les œufs doivent être mirés afin de détecter des fêlures. Les œufs fêlés ne doivent pas être incubés. Les œufs mis en incubation doivent être mirés à nouveau au bout de six à onze jours afin de déterminer leur viabilité.

On doit mesurer l'épaisseur de la coquille d'au moins deux œufs désignés à l'avance dans chaque cage (par exemple, le troisième et le dixième œuf, ou tous les œufs recueillis le 5^{ème}, 20^{ème} et 35^{ème} jour de la ponte). On ne doit pas faire de mesure sur les œufs fêlés, mais on doit noter leur nombre. Les œufs doivent être ouverts, lavés, séchés en gardant la membrane intacte et mesurés en trois ou quatre points sur la circonférence.

Les œufs doivent être transférés des conditions d'incubation aux conditions d'éclosion le 23^{ème} jour pour les colverts, le 21^{ème} jour pour les colins et le 16^{ème} jour pour les cailles. L'éclosion devrait être terminée entre le 25^{ème} et le 27^{ème} jour pour les colverts, entre le 23^{ème} et le 24^{ème} jour pour les colins et entre le 17^{ème} et le 18^{ème} jour pour les cailles.

Les jeunes oiseaux qui viennent d'éclore doivent être logés en groupes selon leur cage d'origine ou bien marqués individuellement et logés tous ensemble. On doit fournir aux oisillons une nourriture appropriée (exempte de substance d'essai) pendant 14 jours. La température et l'humidité qui conviennent aux jeunes oiseaux sont données dans le Tableau 2. L'éclairage doit avoir de préférence un rythme diurne (par exemple 14 heures de lumière pour 10 heures d'obscurité) avec une période de transition de 15 à 30 minutes à l'aurore et au crépuscule ; d'autres régimes d'éclairage sont acceptables.

Observations

Les observations suivantes doivent être faites au cours de l'essai :

- mortalité et signes de toxicité : tous les jours
- poids corporel des adultes : au début de la période d'exposition, avant le commencement de la ponte et à la fin de l'étude
- poids corporel des jeunes : à l'âge de 14 jours
- nourriture consommée par les adultes : sur une ou deux semaines tout au long de l'étude
- nourriture consommée par les jeunes : sur la première et la seconde semaine après l'éclosion
- examen pathologique grossier : tous les oiseaux adultes.

L'analyse de résidus dans des tissus choisis peut être utile dans le cas de substances d'essai caractérisées par une valeur de log P (n-octanol/eau) supérieure à 3,0.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

Les groupes d'essai doivent être comparés individuellement au groupe témoin par une méthode statistique définie dans le plan d'étude. On peut utiliser toute méthode statistique

« Oiseaux, Essai de Reproduction »

généralement acceptable, telle que l'analyse de la variance ou d'autres méthodes applicables signalées dans la référence (8). L'analyse doit inclure les paramètres donnés dans le Tableau 3, ainsi que si c'est possible, le pourcentage de femelles qui ont pondu des œufs, le poids corporel des oiseaux adultes et celui des survivants âgés de 14 jours.

TABLEAU 3 : Valeurs normales* des paramètres relatifs à la reproduction

Paramètre	Colvert	Colin	Caille
Nombre d'œufs pondus par femelle (dix semaines)	28-38	28-38	40-65
Pourcentage d'œufs fêlés	0,6-6	0,6-6	xx-xx
Pourcentage d'embryons viables dans les œufs incubés	85-98	75-90	80-92
Pourcentage d'éclosion dans les œufs incubés	50-90	50-90	65-80
Pourcentage d'oisillons qui survivent jusqu'à 14 jours	94-99	75-90	93
Nombre de survivants âgés de 14 jours, par femelle	16-30	14-25	28-38
Epaisseur des coquilles en mm	0,35-0,39	0,19-0,24	0,19-0,23

* Ces valeurs sont typiques des espèces, mais pas nécessairement représentatives de tous les laboratoires. Si les oiseaux témoins ne donnent pas ces valeurs ou ne s'en approchent pas au plus près, on doit examiner les méthodes et les conditions d'essai afin de rechercher les problèmes éventuels.

- **R a p p o r t**

Le rapport devrait comprendre les informations suivantes :

Substance d'essai : données d'identification chimique.

Animaux d'essai : nom scientifique de l'espèce, souche, âge des oiseaux au début de l'essai (en semaines ou en mois), origine des oiseaux, traitement préalable éventuel, etc.

Conditions d'essai :

- conditions d'encagement : type, dimensions et matériau des cages, température à l'intérieur des cages, humidité approximative, photopériode, ventilation et toute modification survenue au cours de l'essai
- description du régime de base, comprenant l'origine, la composition, l'analyse des constituants fournie par le fabricant (protéines, hydrates de carbone, lipides, calcium, phosphore, etc...), et les suppléments et véhicules éventuels
- régimes d'essai : méthode de préparation, nombre des concentrations utilisées, valeur nominale et, quand la mesure est faite, valeur mesurée de chacune des concentrations de la substance d'essai dans la nourriture, méthode analytique utilisée pour déterminer les concentrations réelles, fréquence de réalisation des mélanges et de renouvellement, véhicule (s'il y a lieu), conditions de stockage, méthode d'application
- méthodes d'acclimatation, méthodes utilisées pour répartir les oiseaux au hasard dans les cages et réarrangements éventuels dûs à des incompatibilités
- pour chaque concentration et pour le groupe témoin le nombre d'oiseaux par cages et le nombre de cages
- méthodes d'identification des œufs et des oiseaux
- conditions de stockage des œufs, d'incubation et d'éclosion, comprenant la température, l'humidité et la fréquence des retournements

« Oiseaux, Essai de Reproduction »

- Le cas échéant, noms des substances toxiques utilisées comme substances de référence et méthodes de préparation des régimes d'essai.

Résultats :

- fréquence, durée et description des signes de toxicité, ainsi que leur gravité, le nombre d'oiseaux atteints et les rémissions éventuelles
- consommation de nourriture et poids corporel des adultes et des jeunes oiseaux
- détails des examens pathologiques grossiers
- résultats des analyses de résidus (si elles ont été faites)
- production d'œufs, œufs mis à incuber, viabilité, éclosabilité (comprenant les oisillons normaux), survie des jeunes et épaisseur moyenne de la coquille (synthèse par concentration et par semaine pour chaque cage pendant la période d'essai, de préférence sous forme de tableau)
- méthodes d'analyse statistique et interprétation des résultats
- CSEO et tous les niveaux de dose pour lesquels on relève des effets statistiquement significatifs
- tout ce qui est inhabituel au sujet de l'essai et tout autre élément intéressant qui aurait pu influencer les résultats.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. U.S EPA : Registration of Pesticides in the United States - Proposed Guidelines, *Federal Register* 43, No. 132 (July 10, 1978).
2. Toxic Substances Control Act, Section 4 : Reproduction Test Standards for Mallard and Bobwhite. Office of Toxic Substances, U.S. EPA, Washington, D.C.

3. National Research Council Laboratory Animal Management : Wild Birds. U.S. National Academy of Sciences, Washington D.C. (1977).
4. National Research Council : Coturnix. Standards and Guidelines for the Breeding, Care, and Management of Laboratory Animals. U.S. National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1969).
5. R.G. Heath, J.W. Spann and J.F. Kreitzer, *Nature* 224, 47-48 (1969).
6. R.G. Heath and J.W. Spann, *Pesticides and the Environment : A Continuing Controversy*, pp. 421-435, Symposia Specialists, North Miami, Florida (1973).
7. G. Heinz, *Bull. Env. Cont. Toxic.* 11, 386-392 (1974).
8. D.J. Finney, *Statistical Methods in Biological Assay*, 3rd ed., Griffin, Weycombe, U.K. or Macmillan, New York (1978).