

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

ABEILLE DOMESTIQUE (*APIS MELLIFERA L.*), ESSAI DE TOXICITÉ CHRONIQUE PAR VOIE ORALE (10 JOURS)

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est une méthode d'essai en laboratoire destinée à évaluer la toxicité chronique par voie orale pendant une période d'exposition de 10 jours pour des ouvrières adultes. L'essai s'inspire de la ligne directrice n° 213 de l'OCDE – Essai de toxicité aiguë par voie orale (1998) (1), (2). Il a été validé par un groupe allemand chargé des essais inter-laboratoires en 2013, un premier essai inter-laboratoires international en 2014 puis un second essai inter-laboratoires international en 2015 (3).

2. Les pollinisateurs tels que les abeilles domestiques peuvent être exposés à des résidus de produits phytopharmaceutiques (PPP) ou d'autres produits chimiques pendant une période prolongée, soit par le biais d'aliments contaminés, stockés et consommés par les abeilles dans la ruche, soit par la recherche de nourriture dans des zones contaminées. Pour étudier ce risque potentiel, une étude de toxicité chronique peut être menée en laboratoire en exposant les jeunes abeilles adultes à des aliments traités (solution de saccharose) pendant 10 jours.

3. Avant d'appliquer la présente Ligne directrice à un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si et, dans l'affirmative, pourquoi cet essai peut fournir des résultats appropriés à cet effet. Ces questions ne se posent pas si l'essai du mélange est prescrit par la réglementation.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. Les produits chimiques d'essai peuvent être testés sous forme de matière active ou de préparation chimique.
5. Les abeilles utilisées dans cet essai doivent être de jeunes ouvrières (âgées de deux jours au maximum) afin de commencer l'essai avec des abeilles d'âge similaire.
6. Une substance chimique servant d'étalon de toxicité doit être utilisée pour vérifier la sensibilité des abeilles et la fiabilité de l'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. De jeunes abeilles (âgées de deux jours au maximum) sont nourries en continu et *ad libitum* avec une solution aqueuse de saccharose à 50 % en poids par unité de volume contenant le produit chimique d'essai pendant 10 jours. La mortalité et les comportements anormaux sont observés et notés quotidiennement pendant les 10 jours de l'essai. Les effets chroniques du produit chimique testé sont évalués en comparant les résultats du groupe traité à ceux du groupe témoin. L'essai vise à déterminer les effets suivants :

- valeurs de la CL₅₀ (concentration létale médiane) et de la LDD₅₀ (dose alimentaire létale médiane) après 10 jours d'exposition.
- CSEO (concentration sans effet observé) et DASEO (dose alimentaire sans effet observé).

Dans certains cas (lorsqu'un produit chimique d'essai est vraisemblablement peu toxique ou lorsqu'un produit chimique d'essai est faiblement hydrosoluble, par exemple), un essai limite peut être exécuté afin de démontrer que la DASEO est supérieure ou égale à la dose limite testée et que la LDD₅₀ est supérieure à la dose limite testée, si aucun effet n'est observé dans l'étude.

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. La validité de l'essai repose sur les critères suivants :
 - La mortalité moyenne dans les réplicats des groupes témoins non traités et des groupes témoins contenant le solvant est ≤ 15 % à la fin de l'essai (soit 10 jours après le début de l'exposition) ; si un témoin solvant est utilisé, la mortalité moyenne dans les réplicats doit être aussi ≤ 15 %.
 - La mortalité moyenne dans le groupe traité avec la substance chimique servant d'étalon de toxicité est ≥ 50 % à la fin de l'essai (soit 10 jours après le début de l'exposition).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Collecte des abeilles

9. Il convient d'utiliser de jeunes abeilles (âgées de deux jours au maximum) issues de rayons de couvain provenant de colonies possédant une reine dans la ruche et dépourvues d'individus malades, et dont on connaît l'historique de la maintenance et de l'état physiologique. La ruche ne doit pas avoir été traitée avec des substances chimiques, telles que des antibiotiques, des produits antivario, etc. un mois au moins avant l'essai. Si une colonie n'est pas en mesure de fournir le nombre d'abeilles approprié, il est possible d'utiliser un ou plusieurs rayons provenant de plusieurs colonies. Il faudra alors s'assurer que les abeilles sont réparties équitablement dans les traitements. Des cadres avec des alvéoles operculées qui devraient s'ouvrir vraisemblablement le même jour peuvent être incubés dans une chambre climatique ou bien être confinés sans abeilles-nourrices dans une cage d'exclusion placée à l'intérieur de la ruche jusqu'à l'éclosion des œufs. Dans le premier cas, il faut assurer une alimentation suffisante soit par du miel et du pollen situés sur un même rayon de couvain soit au moyen d'un rayon supplémentaire contenant de la nourriture. Un jour avant le début de l'essai, les abeilles peuvent être retirées des rayons et réparties dans les cages d'essai. L'anesthésie doit être évitée pendant la collecte. Les abeilles doivent être acclimatées aux conditions d'essai pendant une journée environ (après une période d'éclosion d'une journée). Les abeilles doivent être nourries *ad libitum* avec une solution de saccharose, mais aucune alimentation supplémentaire à base de pollen ou d'eau n'est nécessaire pendant l'acclimatation et la période d'essai. Aucune période de privation alimentaire n'est nécessaire avant le début de l'essai.

Cages d'essai

10. On utilise des cages faciles à nettoyer ou jetables et à ventilation naturelle. Tout matériau approprié peut être employé, par exemple des cages en acier inoxydable, en carton, en toile métallique, en plastique, des cages en bois jetables, etc. Les abeilles sont réparties en groupes de 10 par cage, car ce nombre permet une évaluation précise des abeilles perturbées et non perturbées. Chaque cage doit avoir une dimension permettant d'accueillir 10 abeilles (200 cm³ au minimum).

Solutions nutritives

11. Les solutions nutritives destinées aux traitements témoins, aux traitements contenant le produit chimique d'essai et aux témoins contenant l'étalon de toxicité sont des solutions aqueuses de saccharose à 50 % en poids par unité de volume. Toutes les solutions nutritives doivent être homogènes, sans signes apparents de précipitation au cours d'un intervalle d'alimentation (soit 24 heures environ).

Préparation de la solution-mère et des solutions nutritives traitées

12. Il est possible de préparer une solution-mère du produit chimique d'essai ou bien de mélanger directement celui-ci avec une solution aqueuse de saccharose à 50 % en poids par unité de volume (solution nutritive traitée). Si le produit chimique d'essai est hydrosoluble, de l'eau désionisée est utilisée comme solvant. S'il est faiblement hydrosoluble, l'acétone peut être utilisée comme solvant. La concentration du solvant organique employé dépend de la solubilité du produit chimique d'essai et doit être identique pour toutes les concentrations testées. La concentration maximale d'acétone dans les solutions nutritives finales ne doit pas dépasser 5 %. Il est possible d'utiliser tout autre solvant, solubilisant ou épaississant (pour améliorer l'homogénéité de la solution nutritive pendant l'intervalle d'alimentation de 24 heures, par exemple) tant que le critère de validité des groupes témoins est respecté. Selon la stabilité du produit chimique d'essai dans la solution, la solution-mère ne peut être préparée qu'une seule fois pour toute la période d'essai et doit être stockée de manière appropriée, à savoir dans des récipients hermétiquement fermés, au frais et dans l'obscurité, par exemple dans un réfrigérateur à $6 \pm 2^\circ\text{C}$ environ.

Si le produit chimique d'essai est supposé se dégrader rapidement dans la solution aqueuse ou d'acétone, une nouvelle solution-mère doit être préparée chaque jour ou à intervalles adéquats.

13. Les solutions nutritives finales sont préparées à partir de la solution-mère ou d'une dilution de solutions intermédiaires avec une solution aqueuse de saccharose à 50 % (en poids par unité de volume). Les solutions nutritives finales doivent être préparées au moins tous les quatre jours et conservées dans un réfrigérateur à $6 \pm 2^\circ\text{C}$ lorsqu'elles ne sont pas utilisées.

14. En cas d'utilisation d'acétone (ou d'un autre solvant, solubilisant ou épaississant) comme solvant, deux groupes témoins sont nécessaires : l'un avec une solution aqueuse de saccharose pure à 50 % (en poids par unité) et l'autre avec une solution aqueuse de saccharose à 50 % (en poids par unité) contenant la même concentration d'acétone (ou d'un autre solvant, solubilisant ou épaississant) que le groupe contenant le produit chimique d'essai.

Vérification analytique

15. Si les solutions nutritives sont préparées quotidiennement, alors une fois au cours de la phase expérimentale, au moins une aliquote de la concentration la plus faible et une aliquote de la concentration la plus élevée de ces solutions nutritives doivent être prélevées et stockées directement après la préparation des solutions nutritives dans un congélateur à une température inférieure ou égale à -18°C aux fins de détermination analytique de la concentration réelle du produit chimique d'essai. Si une solution-mère a été utilisée pour la préparation des solutions nutritives, un échantillon supplémentaire de cette solution-mère est également prélevé pour la détermination analytique.

16. Même si la solution-mère ou les solutions nutritives ne sont pas préparées quotidiennement, l'échantillonnage aux fins de détermination analytique est tout aussi nécessaire. Une fois au cours de la phase expérimentale après la préparation ainsi qu'une fois à la fin du délai de stockage maximal, des échantillons doivent être prélevés puis stockés au congélateur (à une température inférieure ou égale à -18°C) au moins en ce qui concerne les concentrations de solutions nutritives et de solution-mère les plus faibles et les plus fortes. Les solutions nutritives ne doivent pas être stockées plus de quatre jours ; de plus, elles doivent être conservées au réfrigérateur.

17. De même, si un nouveau lot de produit chimique d'essai doit être utilisé pendant l'essai, un autre échantillon est nécessaire pour les concentrations les plus faibles et les plus fortes aux fins de la vérification analytique de chaque nouveau lot de produit chimique d'essai. Idéalement, les études doivent être réalisées avec le même lot de produit chimique.

MODE OPÉRATOIRE

Groupes testés et groupes témoins

18. Le nombre de concentrations et de réplicats testés doit se prêter aux exigences statistiques de la détermination de la CSEO/DASEO, de la CL_{50}/LDD_{50} (ou de la CL_x/LDD_x , le cas échéant) avec des limites de confiance de 95 % à la fin de l'essai. L'essai demande normalement au moins cinq concentrations dont le facteur n'excède pas 2.5 et qui englobe la CL_{50} (dans certains cas, par exemple si la relation dose-réponse est monotone, il est possible d'appliquer un facteur d'espacement plus important).

19. Si la toxicité n'est pas connue, un essai de détermination de l'ordre de grandeur permet de déterminer les concentrations à expérimenter dans l'essai final.

20. En cas d'essai de détermination de la relation dose-réponse, un minimum de trois réplicats (cages), contenant chacun 10 abeilles, doivent être utilisés par traitement. Les essais limites doivent être effectués avec cinq réplicats (cages) pour les groupes témoins et les groupes traités avec le produit chimique d'essai et au moins trois réplicats pour le groupe traité avec l'étalon de toxicité.

Étalon de toxicité

21. Un groupe traité avec l'étalon de toxicité doit être inclus dans l'essai. L'étalon de toxicité privilégié est le diméthoate (de qualité technique ou formulé, n°CAS 60-51-5). Il faut utiliser une concentration de l'étalon de toxicité qui entraîne une mortalité escomptée supérieure ou égale à 50 % à la fin de l'essai pour démontrer la sensibilité des abeilles et la fiabilité du système d'essai. Il a été démontré qu'une concentration de 0.5-1.0 mg de matière active (m.a.)/kg de solution nutritive était appropriée pour obtenir une mortalité supérieure ou égale à 50 % à la suite d'une exposition chronique.

Exposition (solutions nutritives)

22. Les solutions nutritives sont fournies aux abeilles domestiques *ad libitum* au moyen de dispositifs tels que des seringues en plastique d'une contenance minimale de 2 ml et dont l'embout a été coupé. Les abeilles d'un même réplicat partagent la solution nutritive (trophallaxie) et devraient donc logiquement toutes être exposées. La solution nutritive est remplacée tous les jours par l'installation de nouveaux dispositifs d'alimentation. Chaque intervalle d'alimentation dure 24 heures (± 2 h). La quantité de solution(s) nutritive(s) consommée(s) est déterminée quotidiennement en commençant par peser les dispositifs d'alimentation avant et après consommation au moyen d'une balance étalonnée.

Évaporation

23. Il est nécessaire de procéder à un ajustement en fonction de l'évaporation potentielle des solutions d'essai des dispositifs d'alimentation en installant des cages d'essai supplémentaires lors de l'essai principal. Ces cages ne contiennent pas d'abeilles, mais uniquement des systèmes d'alimentation pré-pesés contenant de la nourriture provenant du témoin non traité et/ou du témoin avec solvant (chacun testé avec trois réplicats au minimum). Elles doivent être placées dans l'environnement d'essai à côté des unités d'essai. Au moment du changement des dispositifs d'alimentation, qui a lieu tous les jours, les dispositifs en place sont pesés de nouveau puis remplacés par de nouveaux. Ce chiffre représentant la quantité de solution évaporée peut ensuite être soustrait du chiffre représentant la quantité de solution nutritive consommée, ce qui permet d'obtenir la consommation corrigée de la perte par évaporation.

Conditions d'essai

24. Les abeilles doivent être gardées à l'obscurité (hors période d'observation) dans des conditions climatiques contrôlées, à une température de 33°C, avec des déviations maximales de $\pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de 50-70 %. Les déviations de courte durée (≤ 2 heures par jour) par rapport aux conditions d'essai recommandées sont inévitables et ne devraient pas affecter l'intégrité ni le résultat de l'essai.

25. La température et l'humidité doivent être enregistrées en continu au moyen d'un matériel approprié et étalonné.

Durée

26. Les abeilles sont exposées en continu aux solutions nutritives pendant 10 jours.

Observations

27. La mortalité doit être relevée chaque jour à peu près à la même heure (toutes les 24 ± 2 h), le premier relevé ayant lieu 24 ± 2 heures après le début de l'essai (premier apport de solution nutritive).

28. De plus, les comportements anormaux doivent être notés chaque jour en même temps que les évaluations de la mortalité.

29. Les comportements anormaux doivent être observés quantitativement en fonction des catégories suivantes :

- m** = moribond (les abeilles n'arrivent pas à marcher et ne bougent que très faiblement leurs pattes et antennes ; elles ne réagissent que faiblement à des stimulations telles que de la lumière ou un souffle d'air ; elles peuvent se rétablir, mais meurent le plus souvent),
- p** = perturbé (les abeilles se tiennent sur leurs pattes et essaient de marcher mais montrent des signes de coordination réduite ; hyperactivité ; agressivité ; intensification du comportement de nettoyage corporel ; rotations ; tremblements),
- c** = crampes (les abeilles contractent l'abdomen ou tout le corps),

- ap** = apathie (les abeilles ne réagissent que faiblement ou avec retard à des stimulations telles que de la lumière ou un souffle d'air ; les abeilles sont immobiles dans l'unité).
v = vomissements.

30. Les comportements anormaux non répertoriés dans la liste ci-dessus doivent être notés et décrits avec précision.

Après 10 jours d'exposition, les évaluations finales de la mortalité et de la consommation de nourriture sont terminées puis l'essai se termine par la congélation des cages d'essai contenant les abeilles à une température $\leq -10^{\circ}\text{C}$ (de préférence plus basse) ou par d'autres méthodes non violentes.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

31. Les résultats doivent être récapitulés sous forme de tableaux, montrant le nombre d'abeilles employé, la mortalité et le nombre d'abeilles présentant un comportement anormal à observation. Les données sur la mortalité sont analysées par des méthodes statistiquement appropriées (analyses de régression, interpolation par moyenne mobile, probabilité binominale, par exemple) pour calculer la CL_{50} (exprimée en mg/kg) et la LDD_{50} (et la CL_x , s'il y a lieu) (exprimées en μg ou ng/abeille/jour) avec des limites de confiance de 95 % ainsi que la CSEO/DASEO à la fin de l'essai. Les corrections relatives à la mortalité des témoins peuvent s'effectuer selon les méthodes standards (méthode d'Abbott, [4], par exemple) :

32. Les résultats relatifs à la consommation de nourriture doivent être calculés et affichés comme suit :

- consommation moyenne de solution nutritive par abeille par jour (mg/abeille) ; le nombre d'abeilles vivantes au début de chaque intervalle d'alimentation est pris en compte pour ce calcul ;
- consommation quotidienne moyenne globale de solution nutritive par traitement au cours de l'essai (mg/abeille/jour) ;
- consommation quotidienne moyenne globale de solution nutritive par réplicat au cours de l'essai (mg/abeille/jour) ;
- absorption moyenne de produit chimique d'essai par abeille par jour (μg ou ng de m.a./abeille/jour) ;
- absorption cumulée de produit chimique d'essai par abeille au cours de l'essai (μg ou ng de m.a./abeille).

33. Il est nécessaire de procéder à un ajustement en fonction de l'évaporation potentielle des solutions d'essai des dispositifs d'alimentation. Si le résultat de la soustraction de la quantité de solution évaporée de la quantité de solution nutritive consommée est négatif, la consommation alimentaire du jour concerné est considérée comme nulle (« 0 ») (absence de consommation alimentaire).

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai et étalon de toxicité :

- Substance mono-constituant : apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ; identification chimique telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si cela est faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique s'il y a lieu).
- Substance multi-constituants, UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques) et mélanges : caractérisés dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physicochimiques pertinentes des constituants.
- source, numéro de lot, date de péremption ;
- stabilité du produit chimique d'essai en soi, si possible ;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans l'eau et le solvant (si un solvant est utilisé).

Système d'essai :

- informations sur l'espèce testée (nom scientifique, race, âge, méthode d'incubation et de collecte, informations sur les colonies utilisées telles que l'état de santé, le prétraitement, etc.).

Conditions d'essai :

- conditions pendant l'incubation, l'acclimatation (s'il y a lieu) et l'essai ;
- description des cages d'essai (type, matériau, dimension) ;
- méthode et fréquence de préparation de la solution-mère et des solutions nutritives ;
- conception de l'essai (nombre de groupes de traitements (témoin(s), produit chimique d'essai, étalon de toxicité), nombre de réplicats, nombre d'abeilles par cage);
- date du début et de la fin de l'essai.

Résultats :

- mortalité à chaque observation pour tous les traitements testés ;
- consommation de solution nutritive à chaque observation pour tous les traitements testés ;

- concentrations d'essai nominales utilisées et concentrations mesurées du produit chimique d'essai dans les solutions nutritives et méthode d'analyse utilisée ;
- chiffres relatifs à l'évaporation ;
- valeurs de la CL_{50}/LDD_{50} , de la CSEO/DASEO et/ou de la CL_x si certaines d'entre elles sont applicables avec des limites de confiance de 95 % pour le produit chimique testé à la fin de l'essai ; description de toutes les méthodes statistiques employées dans cette étude ;
- autres effets biologiques observés (comportements anormaux, effets anorexigènes, par exemple) ;
- tout écart à la Ligne directrice et toute autre information pertinente.

RÉFÉRENCES

- (1) OECD (1998). Guideline for the Testing of Chemicals, No. 213: Honey bee: acute oral toxicity test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (2) Kling, A. & Schmitzer, S. (2015): Proposal for a new OECD guideline for the testing of chemicals on adult honey bees (*Apis mellifera* L.) in a 10 day chronic feeding test in the laboratory and results of the recent ring test 2014. Hazards of pesticides to bees - 12th International Symposium of the ICP-PR Bee Protection Group, Ghent (Belgium), 15-17 September 2014. Julius-Kühn-Archiv, 450, pp. 69-74.
- (3) OECD (2017), Summary of the Results of the 1st International Ring Test for the Standardisation of a 10 Day Chronic Feeding Test on Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in the Laboratory. ENV Publication, Series on Testing and Assessment No. 277, Paris.
- (4) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

ANNEXE

DÉFINITIONS

CL₅₀ (concentration létale médiane) : concentration d'une substance déduite statistiquement qui devrait provoquer la mort de 50 % des organismes testés à la fin de l'essai. Elle est exprimée, par exemple, en mg ou µg de matière active ou de préparation chimique par kg de nourriture.

LDD₅₀ (dose alimentaire létale médiane) : dose alimentaire de substance déduite statistiquement qui devrait causer la mort de 50 % des organismes testés à la fin de l'essai. Elle est exprimée, par exemple, en µg ou ng de matière active ou de préparation chimique par abeille par jour.

CSEO (concentration sans effet observé) : la concentration d'essai la plus élevée, juste en deçà de la **CMEO** (concentration minimale avec effet observé). S'il est impossible de déterminer la **CMEO**, la **CSEO** est considérée comme supérieure ou égale à la plus forte concentration testée. Si, dans un essai limite, aucun écart statistiquement significatif n'est décelé entre l'effet à la concentration testée et le témoin, la **CSEO** est considérée comme supérieure ou égale à la concentration testée. Elle est exprimée, par exemple, en mg ou µg de matière active ou de préparation chimique par kg d'aliment.

DASEO (dose alimentaire sans effet observé) : la dose d'essai la plus élevée par abeille par jour, administrée par exposition alimentaire chronique, juste en deçà de la **DAMEO** (dose alimentaire minimale avec effet observé). S'il est impossible de déterminer la **DAMEO**, la **DASEO** est considérée comme supérieure ou égale à la plus forte dose testée. Si, dans un essai limite, aucun écart statistiquement significatif n'est décelé entre l'effet à la dose testée et le témoin, la **DASEO** est considérée comme supérieure ou égale à la dose testée. Elle est exprimée, par exemple, en µg ou ng de matière active ou de préparation chimique par abeille par jour.

CMEO/DAMEO (concentration/dose alimentaire minimale avec effet observé) : la plus faible des concentrations testées, à laquelle aucun écart statistiquement significatif n'est observé par rapport au groupe témoin.

CL_x (concentration létale avec x % d'effet) : concentration qui provoque x % d'un effet au cours d'une période d'exposition donnée par rapport à un témoin.

AUTRES ÉVALUATIONS

Les données générées dans le cadre d'un essai de toxicité chronique par voie alimentaire testée pendant 10 jours permettent d'effectuer un calcul basé sur la loi de Haber et de déterminer ainsi la toxicité cumulée potentielle des produits chimiques testés. La publication/le protocole de J. E. Cresswell, Université d'Exeter (<http://hdl.handle.net/10871/25123>) peut fournir des indications complémentaires à ce sujet.