

Comité Scientifique et Technique  
de l'Etude Multifactorielle  
des Troubles des Abeilles

Imidaclopride utilisé en enrobage de  
semences (Gaucho®) et troubles des  
abeilles  
Rapport final

Date de diffusion : 18 septembre 2003

# Comité Scientifique et Technique de l'Etude Multifactorielle des Troubles des Abeilles (CST)

## Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho®) et troubles des abeilles Rapport final

### Auteurs

C. Doucet-Personeni  
MP. Halm  
F. Touffët  
A. Rortais  
G. Arnold

*Centre d'Etudes et de Recherche Sur le Médicament de Normandie*  
Université de Caen, 5 rue Vaubénard  
14032 Caen cedex  
*Laboratoire Populations, Génétique et Evolution*  
CNRS, 91198 Gif-sur- Yvette

### Membres du CST

#### Présidents

D. Marzin: Institut Pasteur Lille  
S.Rault : CERMN, Université de Caen

G. Arnold	CNRS
M. Aubert	AFSSA
J.M. Barbançon	FNOSAD
C. Doucet-Personeni	CERMN, Université de Caen
B. Declercq	DGCCRF
P. Deschamps	Cabinet Paracelse
J.P. Faucon	AFSSA
F.Lagarde	CETIOM
M.P. Halm	CERMN, Université de Caen
M. Le Béhec	FNOSAD
J.P.Carlier	DGAL/SDSPA, Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires Rurales
A. Rortais	CERMN, Université de Caen
M. Sanaa	ENVA
J.N. Tasei	INRA
E. Thybaud	INERIS
F. Touffët	CERMN, Université de Caen
P. Vasseur	CSE, Université de Metz

### Secrétaire de séances

D. Poujeaux Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires Rurales

<b>PREAMBULE.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>6</b>
<b>PREMIERE PARTIE : IMIDACLOPRIDE ET METABOLITES.....</b>	<b>6</b>
1. Liste des rapports et publications recensés sur les troubles des abeilles.....	6
2. Rappel des propriétés physico-chimiques.....	6
3. Données d'exposition.....	6
3.1 Dosages dans le pollen.....	6
3.2 Dosages dans le nectar.....	7
3.3 Dosages dans les sols.....	7
3.4 Dosages dans les végétaux.....	7
3.5 Quantités d'imidaclopride rentrant dans la ruche.....	7
3.6 Quantités d'imidaclopride présentes dans les autres « produits de la ruche ».....	7
4. Données de toxicité liées à l'utilisation de l'imidaclopride.....	7
4.1 Mortalité suite à une seule administration de substance active (toxicité aiguë).....	7
4.2 Mortalité suite à une administration réitérée de substance active (toxicité chronique).....	8
4.3 Effets sublétaux.....	8
<b>DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES RISQUES.....</b>	<b>8</b>
5. Scénarios d'exposition des abeilles pour évaluer les risques d'intoxication.....	8
6. Evaluation des risques.....	9
6.1 Evaluation de l'exposition (PEC):.....	9
6.2 Evaluation des effets (PNEC).....	10
7. Conclusions pour l'estimation du risque.....	11
<b>TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR L'ACQUISITION DES DONNEES AYANT FAIT DEFAUT AU COURS DE L'EVALUATION DES RISQUES.....</b>	<b>12</b>
8. Recommandations.....	12
9. Travaux à réaliser pour compléter l'étude multifactorielle.....	12
<b>PREMIERE PARTIE: IMIDACLOPRIDE ET METABOLITES.....</b>	<b>13</b>
<b>1 LISTE DES RAPPORTS ET PUBLICATIONS RECENSEES SUR LES TROUBLES DES ABEILLES.....</b>	<b>13</b>
<b>2 RAPPEL DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES.....</b>	<b>13</b>
2.1 Identité.....	13
2.2 Propriétés physiques et chimiques.....	14
2.3 Comportement dans l'environnement.....	14
<b>3 DONNEES D'EXPOSITION.....</b>	<b>14</b>
3.1 Dosages dans le pollen.....	14
3.1.1 Dosages dans le nectar.....	21
3.2 Dosages de l'imidaclopride dans les sols et rémanence.....	23
3.3 Devenir de l'imidaclopride dans la plante.....	27
3.4 Evaluation des quantités de pollen et de nectar éventuellement contaminées et ramenées à la ruche.....	35
3.4.1 Cas du pollen.....	35
3.4.2 Cas du nectar et du miel de tournesol.....	38
3.5 Récapitulatif concernant les Données d'expositions sur tournesol et maïs.....	40
3.5.1 Critères de validations :.....	40
3.5.2 Dosages de l'imidaclopride dans les pollens de tournesol et de maïs :.....	40
<b>3.5.3</b> Dosages de l'imidaclopride dans le nectar de tournesol.....	41
<b>3.5.4</b> Dosages de l'imidaclopride dans les sols et rémanence.....	41
3.5.5 Dosages de l'imidaclopride dans les parties végétales de tournesol et maïs non visitées par les abeilles.....	42
<b>4 DONNEES DE TOXICITE.....</b>	<b>43</b>
4.1 Effets létaux de l'imidaclopride et de ses dérivés sur les abeilles.....	43
4.1.1 Mortalité suite à une intoxication par une seule administration de substance active.....	43
4.1.2 Mortalité suite à une intoxication chronique (administration réitérée de la substance active).....	47

4.2	Effets sublétaux de l'imidaclopride et de ses dérivés sur les abeilles .....	55
4.2.1	Etudes menées en laboratoire.....	55
4.2.2	Etudes menées sous tunnels et en cages de vol.....	63
4.3	Récapitulatif et Recommandations concernant les Données de Toxicité de l'imidaclopride et de ces métabolites.....	76
4.3.1	Intoxication aiguë (1 seule administration).....	76
4.3.2	Intoxication Chronique.....	76
4.3.3	Effets sublétaux.....	77
<b>DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES RISQUES.....</b>		<b>82</b>
<b>5</b>	<b>EVALUATION DES EFFETS.....</b>	<b>82</b>
5.1	Méthodologie.....	82
5.2	Evaluation des effets à partir de données de toxicité aiguë suite à 1 seule administration d'imidaclopride.....	84
5.3	Evaluation des effets à partir de données de toxicité chronique suite à l'administration réitérée d'imidaclopride par voie orale.....	84
5.4	Evaluation des effets à partir des études de toxicité sublétale.....	85
5.4.1	Etudes en laboratoire.....	85
5.4.2	Etudes menées sous tunnel.....	86
5.4.3	Etudes en plein champ.....	86
5.4.4	Récapitulatif sur le calcul des PNEC.....	87
<b>6</b>	<b>EVALUATION DE L'EXPOSITION.....</b>	<b>87</b>
6.1	Le calcul des concentrations prédites d'exposition (PEC).....	87
6.2	Cas du pollen.....	88
6.3	Cas du nectar et du miel.....	91
<b>7</b>	<b>EVALUATION DES RISQUES.....</b>	<b>94</b>
7.1	Scénario 1 : consommation de pollen par les larves.....	95
7.2	Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices.....	96
7.3	Scénario 3 : les butineuses de pollens : intoxication par voie orale.....	98
7.4	Scénario 4 : les butineuses de nectar de tournesol.....	99
7.5	Scénario 5 : les abeilles d'intérieur.....	99
<b>TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR L'ACQUISITION DES DONNEES AYANT FAIT DEFAUT AU COURS DE L'EVALUATION DES RISQUES.....</b>		<b>103</b>
<b>8</b>	<b>RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES DONNEES D'EXPOSITION DES ABEILLES.....</b>	<b>103</b>
8.1	Données à acquérir concernant l'imidaclopride et ses métabolites.....	103
8.2	Recommandations générales.....	103
<b>9</b>	<b>RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES DONNEES DE TOXICITE PAR ADMINISTRATION REITEREE DE SUBSTANCE ACTIVE.....</b>	<b>103</b>
9.1	Données à acquérir concernant l'imidaclopride et ses métabolites.....	104
9.2	Recommandations générales relatives aux études des effets létaux ou sublétaux.....	104
9.3	Recommandations générales relatives aux études en enceinte et en champ.....	104
<b>10.</b>	<b>TRAVAUX A REALISER POUR COMPLETER L'ETUDE MULTIFACTORIELLE.....</b>	<b>105</b>
<b>DEFINITIONS.....</b>		<b>106</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>

## PREAMBULE

Le Ministre de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales décidait en janvier 1999 puis en février 2001 d'appliquer le principe de précaution pour répondre aux alarmes des apiculteurs face aux affaiblissements massifs des ruchers français, en suspendant l'utilisation du Gaucho pour les traitements des semences de tournesol.

Parmi les mesures d'accompagnement, le Ministre décidait la création d'un Comité Scientifique et Technique chargé de piloter une étude multifactorielle des troubles des abeilles. Ce comité s'est mis en place sous la présidence conjointe des professeurs Marzin et Rault en juin 2001 et a réellement commencé ses travaux en octobre 2001.

Face à la tâche assez considérable, et compte tenu des très grandes divergences d'opinions sur la question, les experts ont défini parmi les orientations prioritaires celle de conduire un grand inventaire des connaissances scientifiques et techniques relatives à plusieurs aspects du problème :

1. A propos du Gaucho et de sa substance active l'imidaclopride, dans ses aspects toxiques, écotoxiques, métaboliques, etc.,
2. A propos des troubles des abeilles réellement observés (intoxications, viroses, parasitoses, etc.),
3. A propos du devenir des substances d'enrobage au cours de la croissance, et de la floraison des plantes (en particulier dans le nectar et le pollen), ainsi que dans les sols,
4. A propos des modifications génétiques apportées au tournesol, et en particulier dans son mode de pollinisation,
5. A propos des réelles données économiques concernant la baisse ou non des miellées dans la France entière.

Ce travail d'inventaire et de bibliographie a été confié à un sous-groupe dit sous-groupe "métrologie". Parallèlement, le comité a créé un sous-groupe « réseau » avec pour objet la mise en place de deux types d'observations :

- pour l'année 2002, un premier réseau d'alerte et d'information dit « Ré.SATA » dont le rôle est simplement de situer dans l'espace et dans le temps la survenue des intoxications sur le territoire français,
- à compter de l'année 2003, un réseau d'analyse multifactorielle s'intéressant de près à la nature et aux causes des troubles réels des abeilles dans plusieurs points du territoire.

Le présent rapport a pour objet de présenter les conclusions du sous-groupe métrologie. Devant le volume de travail, et afin d'éviter la dispersion à laquelle peut conduire une analyse centrifuge de nombreux paramètres, **le groupe s'est principalement attaché à étudier ce qui au départ a conduit à la décision ministérielle, c'est à dire l'éventuel rôle du Gaucho et de l'imidaclopride dans les troubles observés antérieurement. Il va de soi que cette approche centrée sur le phénomène de départ sera élargie à d'autres facteurs, c'est à dire d'autres produits phytosanitaires, la combinaison des effets de ceux-ci avec des pathologies, des pratiques apicoles particulières, des mauvais usages agricoles, etc.**

## RESUME

Devant le volume de travail, et afin d'éviter la dispersion à laquelle peut conduire une analyse centrifuge de nombreux paramètres, le groupe de travail s'est principalement attaché à étudier ce qui au départ a conduit à la décision ministérielle, c'est à dire l'éventuel rôle du Gaucho et de l'imidaclopride dans les troubles observés antérieurement. Ce rapport fait un bilan de l'état actuel des connaissances sur les risques liés à l'utilisation de l'imidaclopride comme traitement de semences sur tournesol et maïs pour les abeilles. Il présente les conclusions du sous-groupe métrologie qui ont été validées par l'ensemble des membres du CST. La rédaction suit le plan classique d'une évaluation de risques pour l'environnement, en distinguant l'analyse de l'exposition de celle des effets.

Enfin, devant les problèmes rencontrés lors de la validation des différentes données, un chapitre « recommandations » a été intégré à ce rapport en vue d'une amélioration de la pertinence des études futures.

Il va de soi que cette approche centrée sur le phénomène de départ sera élargie à d'autres facteurs, c'est à dire à d'autres produits phytosanitaires, à la combinaison des effets de ceux-ci avec des pathologies, aux pratiques apicoles particulières, aux mauvais usages agricoles, etc.

### PREMIERE PARTIE : IMIDACLOPRIDE ET METABOLITES

#### **1. Liste des rapports et publications recensés sur les troubles des abeilles**

Dans ce paragraphe sont présentés les documents concernant les données d'expositions et de toxicité, à la base de l'analyse bibliographique :

- 245 rapports d'études ou documents associés fournis par la Direction Générale de l'Alimentation
- 93 documents issus de la littérature scientifique et technique.

#### **2. Rappel des propriétés physico-chimiques**

Les principales caractéristiques physico-chimiques, toxicologiques, environnementales de l'imidaclopride sont reprises dans ce chapitre.

#### **3. Données d'exposition**

Ce paragraphe est dévolu à l'analyse des données d'exposition, dosages dans le pollen, le nectar, les sols et dans la plante, puis à la validation de ces données. Elles sont extraites de quinze études issues de laboratoires français et européens, publics et privés.

##### **3.1 Dosages dans le pollen**

La validation des données permet de conclure que les niveaux de résidus d'imidaclopride contenus dans les pollens de fleurs de tournesol dont les semences ont été traitées Gaucho se situent en moyenne à 3,3 ppb, ceux contenus dans les pollens de trappes de ruches sur zone tournesol sont en moyenne de 2,2 ppb. En ce qui concerne les dosages dans le pollen de maïs, les données validées montrent des teneurs moyennes en imidaclopride de 0,75 et 3,5 ppb pour les pollens de fleurs et de trappe respectivement. Compte tenu des modifications d'activité de la colonie que peuvent entraîner la pose de trappe à pollen, seuls les dosages d'imidaclopride obtenus à partir de pollen fleurs sont retenus comme représentatifs des quantités d'imidaclopride rentrant dans la colonie. La valeur de 3,3 ppb est donc retenue pour les scénarios d'exposition et l'évaluation des risques liés à l'utilisation de l'imidaclopride en

enrobage de semences tournesol, celle de 3,5 ppb est retenue pour les risques liés à l'utilisation d'imidaclopride en enrobage de semences maïs.

### 3.2 Dosages dans le nectar

L'analyse des rapports d'études ne valide qu'une seule étude qui permet d'indiquer que le niveau de résidus contenus dans le nectar de tournesol dont les semences ont été traitées Gaucho se situe à 1,9 ppb. Les autres études ne répondent pas aux critères de validation (méthode peu spécifique, limite de quantification élevée ou nombre d'échantillons faible).

### 3.3 Dosages dans les sols

L'imidaclopride est décelé dans les sols ayant été le support de cultures de Tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement à des teneurs moyenne de 10,25 ppb. L'année suivant le traitement, les quantités d'imidaclopride diminuent et sont en moyenne de 4,4 ppb. Il n'est cependant pas possible de conclure au-delà d'une année en raison d'un mauvais suivi de l'échantillonnage.

### 3.4 Dosages dans les végétaux

L'analyse des rapports d'études ne valide partiellement qu'une seule étude en raison d'un mauvais suivi de l'échantillonnage. A titre indicatif, une teneur moyenne de 4,6 ppb d'imidaclopride dans un Tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement a été calculée en regroupant les différents échantillons de feuilles, tiges, capitules. Il n'a pas été possible de conclure lorsque les sols ont reçu des plantes traitées Gaucho l'année précédente. En ce qui concerne le maïs traité Gaucho, les teneurs en imidaclopride dans les différentes parties végétales sont de 3,7, 3 et 7,5 dans les feuilles et tiges confondues, les parties mâles et les panicules respectivement.

### 3.5 Quantités d'imidaclopride rentrant dans la ruche

Dans cette partie, nous avons d'abord évalué les quantités théoriques totales d'imidaclopride ramenées à la ruche dans le pollen et le nectar contaminés. Pour le pollen de tournesol ramené annuellement à la colonie, ces quantités pourraient varier entre 0,84 µg et 50µg. Pour le nectar de tournesol, la seule étude validée, nous permet d'estimer une quantité variant de 133 µg à 266 µg. L'imidaclopride peut être également ramené à la colonie par le pollen de maïs en quantités variables : de 0,04 à 66 µg.

### 3.6 Quantités d'imidaclopride présentes dans les autres « produits de la ruche »

A l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucune donnée concernant les dosages de résidus d'imidaclopride dans la gelée royale, la bouillie larvaire, le pain d'abeille, la cire etc...

## 4. Données de toxicité liées à l'utilisation de l'imidaclopride

La troisième partie est consacrée à l'analyse des effets de l'imidaclopride sur les abeilles avec l'étude des résultats issus des essais de toxicités aiguë, chronique et sublétales. Les résultats disponibles sont ensuite validés ou invalidés par le CST.

### 4.1 Mortalité suite à une seule administration de substance active (toxicité aiguë)

Les résultats présentés en toxicité aiguë par voie orale pour l'imidaclopride proviennent de protocoles expérimentaux standardisés et donnent des résultats convergents avec des DL<sub>50</sub> allant de 4 ng à 71 ng d'imidaclopride par abeille. Toutes les études disponibles sont validées. En ce qui concerne les résultats de la toxicité aiguë par voie topique, on obtient des valeurs de DL<sub>50</sub> allant de 6,7ng à 242 ng d'imidaclopride par abeille.

L'oléfine et l'hydroxyimidaclopride, métabolites de l'imidaclopride, présentent également une toxicité en administration par voie orale. L'oléfine présente une DL50 variant de 28 à >35,7 ng de substance active/abeille, l'hydroxyimidaclopride une DL50 de 153 à 258 ng de substance active/abeille.

Les autres métabolites (acide 6 chloronicotinique, dihydroxyimidaclopride, dérivée urée et guanidine) ne présentent pas de toxicité particulière (DL50>1000 ng/substance active/abeille)

#### 4.2 Mortalité suite à une administration répétée de substance active (toxicité chronique)

Les études portant sur la toxicité chronique de l'imidaclopride et ses métabolites montrent des résultats divergents en partie dus à une grande hétérogénéité des protocoles rendant les études peu comparables entre elles et difficiles à valider.

Seules 2 études d'intoxication par administration répétée d'imidaclopride par voie orale ont été validées. L'une conduit à une DL50 de 12 pg/abeille sur 10 jours (Suchail, 2001), l'autre à une NOEC de 1700 pg/abeille/10 jours (Decourtye, 2000). Les études portant sur l'intoxication chronique par voie orale par les métabolites de l'imidaclopride donnent également des résultats divergents avec une DL50 à 12 pg/abeille sur 10 jours pour tous les métabolites ou une NOEC entre 2740 et 8000 pg/abeille sur 10 jours pour le dérivé urée et l'acide 6 chloronicotinique.

#### 4.3 Effets sublétaux

De nombreuses études se sont intéressées aux effets sublétaux. Elles sont très diverses et hétérogènes. Elles ont étudiés les effets sublétaux en laboratoire, en cages de vol et sous tunnel ou en plein champ

En laboratoire, les données de toxicité orale aiguë validées montrent une NOEC de 940 pg d'imidaclopride/abeille pour la coordination motrice et l'effet knockdown. Lors d'une intoxication par administration orale répétée d'imidaclopride, la NOEC est de 200 pg d'imidaclopride/abeille sur 10 jours pour le réflexe d'extension du proboscis. Pour les données d'intoxication aiguë par voie topique, on obtient une LOEC de 100pg d'imidaclopride/abeille, aucune donnée d'intoxication par administration répétée d'imidaclopride par voie topique n'a été validée.

L'administration des métabolites de l'imidaclopride en une seule fois par voie orale conduit à des NOEC supérieures, de 1200 à 7000 pg de substance active/abeille.

Les études validées en cages de vol et sous tunnels donnent, suite à des intoxications par administrations répétées de substances actives par voie orale, des LOEC de 75 pg d'imidaclopride/abeille et hydroxyimidaclopride/abeille et de 20 pg d'oléfine/abeilles pour les effets « fréquentation du nourrisseur et durée de la prise alimentaire ».

Lorsque l'imidaclopride ou l'oléfine sont disposés dans un nourrisseur en plein champs, les résultats d'intoxication par ingestion répétée de substance active montrent des NOEC de 250 ng d'imidaclopride/abeille pour tous les items comportementaux observés et une NOEC de 250 ng d'oléfine/abeille pour les danses tremblantes.

## DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES RISQUES

### 5. Scénarios d'exposition des abeilles pour évaluer les risques d'intoxication

Nous avons proposé cinq scénarios correspondant aux différents modes d'intoxication possibles (intoxication orale ou topique) des différentes stades de la vie de l'abeille (larves,

nourrices, butineuses) par le pollen (scénarios 1, 2, 3), le nectar ou le miel (scénarios 3, 4 et 5), soit à la suite d'une consommation immédiate, soit à la suite d'une consommation différée.

## 6. Evaluation des risques

L'évaluation des risques consiste à comparer une concentration prédite d'exposition, communément appelée "PEC" (*Predicted Environmental Concentration*) à une concentration prévue sans effets pour les organismes de l'environnement, encore appelée "PNEC" (*Predicted No Effect Concentration*). Un risque est alors mis en évidence quand la valeur estimée de la PEC est supérieure à celle de la PNEC.

L'évaluation des risques pour les abeilles liés à l'utilisation de l'imidaclopride en enrobage de semences a été réalisée selon l'approche « substances chimiques nouvelles et existantes », développée dans le cadre de la réglementation des substances chimiques nouvelles et existantes (Directive 67/548). L'approche phytosanitaire, développée dans le cadre de la réglementation des produits phytosanitaires (Directive 91/414), ne peut s'appliquer dans le cas d'enrobage de semences puisqu'elle est basée sur la notion de doses à l'hectare qui n'a pas de sens réel dans notre cas.

### 6.1 Evaluation de l'exposition (PEC):

- Pour le scénario 1 (alimentation des larves) en considérant que le sucre constituant la bouillie larvaire provient entièrement du nectar récolté, la quantité d'imidaclopride ingéré par une larve au bout de 5 jours a été estimée entre 1,1 et 87 pg, cette quantité dépendant du pourcentage de contamination du nectar de tournesol ingéré. Par ailleurs, la quantité de pollen ingérée a été considérée comme négligeable en regard de la quantité totale d'aliments ingérés par la larve.
- Pour le scénario 2 (consommation de pollen par les nourrices) en supposant une stabilité totale de l'imidaclopride lors du stockage du pollen dans la ruche, la quantité d'imidaclopride absorbée par les abeilles dépend, à la fois, du pourcentage de pollen contaminé qu'elle ingère, et de la concentration d'imidaclopride dans ce pollen. Elle serait comprise entre 40 pg et 180 pg par abeille (pire cas, peu probable) lorsque la nourrice consomme du pollen de tournesol et entre 42pg et 168 pg lors de la consommation de pollen de maïs. On notera que ces nourrices pourront également s'intoxiquer en consommant du miel contaminé (scénario 5).
- Pour le scénario 3 (ingestion de pollen par les butineuses), en estimant arbitrairement à 1% la proportion de pollen ingéré par les butineuses de pollen lors de la confection de pelotes, la quantité d'imidaclopride ingéré varie entre 3,3 et 15 pg par abeille pour du pollen de tournesol et entre 3,5 et 16pg pour le pollen de maïs. En raison de la fidélité florale des abeilles, le pourcentage de pollen contaminé ingéré sera de 0 ou 100% selon le traitement du champs (non Gaucho ou Gaucho). Ces butineuses pourront également s'intoxiquer en consommant du miel pour stocker l'énergie nécessaire à leur vol (scénario4).
- -Pour le scénario 4 (consommation de nectar par les butineuses), la quantité d'imidaclopride dépend du pourcentage de nectar de tournesol contaminé que la butineuse ingère pour fournir l'énergie nécessaire au vol, et de la concentration d'imidaclopride dans ce nectar de tournesol. En estimant à 12 heures, le temps moyen de butinage quotidien, la butineuse de nectar ingère entre 131 pg et 655 pg d'imidaclopride par abeille.
- Pour le scénario 5 (consommation de miel de réserve par les abeilles d'intérieur pour assurer la thermorégulation), en supposant une stabilité totale de l'imidaclopride lors de la transformation du nectar en miel, la quantité d'imidaclopride absorbée par les abeilles

dépend du pourcentage de miel contaminé qu'elle ingère et de la concentration d'imidaclopride dans ce miel. En partant d'une consommation de 0,2 à 0,8 g de miel par abeille pour maintenir une température de 15°C au centre de la ruche et de 5°C à la périphérie, la quantité d'imidaclopride ingérée par abeille varie entre 190 et 3800 pg selon le pourcentage de nectar de tournesol contaminé ayant servi à la production du miel.

## 6.2 Evaluation des effets (PNEC)

La PNEC est évaluée à partir ,soit des données d'intoxication aiguë dont nous disposons soit des données d'intoxication chronique, soit des données de toxicité sublétales en lui associant un facteur d'incertitude déterminé au cas par cas. Ce facteur prend en compte les incertitudes suivantes :

- la variation intra- et inter-laboratoire,
- l'extrapolation des données de toxicité du court-terme au long terme,
- l'extrapolation du laboratoire au plein champ.

L'adaptation de l'approche « substances chimiques nouvelles et existantes » aux cas spécifiques représentés par l'exposition des abeilles selon les différentes données d'intoxications ont conduit aux estimations présentées dans le tableau ci-dessous :

		Variable observée	Facteur d'incertitude	PNEC
<b>Intoxication par voie orale</b>				
<b>Toxicité aiguë</b>				
DL50 48h = 4 ng/ab		Mortalité	100	40 pg/ab
<b>Toxicité chronique par voie orale</b>				
DL50 10j = 0,012 ng/ab		Mortalité	10	1,2 pg/ab
<b>Toxicité sublétales</b>				
<i>Laboratoire</i>	<b>1 seul traitement par voie orale</b> NOEC = 0,94 ng/ab	Modifications comportementales	50	20 pg/ab
	<b>Traitement réitéré par voie orale</b> NOEC = 0,2 ng/ab	Modifications comportementales	10	20 pg/ab
<i>Sous tunnel</i>	<b>Sur nourrisseur, traitement réitéré</b> LOEC = 0,075 ng/ab	Modifications comportementales	10	7,5 pg/ab
<i>Plein champ</i>	<b>Sur nourrisseur, traitement réitéré</b> NOEC = 0,25 ng/ab	Modifications comportementales	5	50 pg/ab
<b>Intoxication par voie topique topique</b>				
<b>Toxicité aiguë</b>				
DL50 = 6,7 ng/ab		Mortalité	100	67 pg/ab
<b>Toxicité sublétales</b>				
<i>Laboratoire</i>	<b>1 seul traitement par voie orale</b> LOEC = 0,1 ng/ab	Modifications comportementales	50	2 pg/ab

## 7. Conclusions pour l'estimation du risque

Les rapports PEC/PNEC obtenus selon les scénarios sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Scénario	Rapport PEC/PNEC selon le pourcentage de contamination des produits consommés		Commentaires relatifs aux scénarios
	A partir d'une exposition à du Tournesol traité Gaucho	A partir d'une exposition à du Maïs traité Gaucho	
Scénario 1 : consommation de « bouillie larvaire » par les larves	Rapport PEC/PNEC non déterminé par absence de données de toxicité		<b>Absence de données :</b> - de toxicité - de dosages de résidus dans la gelée royale et la « bouillie larvaire » - sur la stabilité de l'imidaclopride au cours du stockage dans la ruche
Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices	2 à 9 (151*)	2,1 à 9 (151*)	<b>Absence de données :</b> - sur la stabilité de l'imidaclopride au cours du stockage du pollen dans la ruche - de dosages de résidus dans le pain d'abeilles
Scénario 3 : consommation de pollen par les butineuses	0,07 à 0,3 (12*)	0,07 à 0,32 (13*)	<b>Scénario reposant sur une estimation</b> de la proportion de pollen ingéré lors de la confection de pelotes
Scénario 4 : consommation de nectar par les butineuses	2,6 à 13 (546*)	maïs = plante non nectarifère	<b>Absence de données :</b> - de dosages de résidus dans le miel stocké à la ruche <b>Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar</b>
Scénario 5 : consommation de miel par les abeilles d'intérieur	9,5 à 190 (3166*)	maïs = plante non nectarifère	<b>Absence de données :</b> -de dosages d'imidaclopride dans le miel -sur la stabilité de l'imidaclopride dans le miel lors de son stockage dans la ruche <b>Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar</b>

\* ratio obtenu à partir des données de Suchail (cas extrême)

Dans l'état actuel de nos connaissances, selon les scénarios développés pour évaluer l'exposition et selon les facteurs d'incertitude choisis pour évaluer les dangers, les rapports PEC/PNEC obtenus sont préoccupants. Ils sont en accord avec les observations de terrain rapportées par de nombreux apiculteurs en zones de grande culture (maïs, tournesol), concernant la mortalité des butineuses (scénario 4), leur disparition, leurs troubles comportementaux et certaines mortalités d'hiver (scénario 5).

En conséquence, l'enrobage de semences de tournesol Gaucho® conduit à un risque significatif pour les abeilles de différents âges, à l'exception de l'ingestion de pollen par les butineuses lors de la confection de pelotes (scénario 3).

En ce qui concerne l'enrobage Gaucho® de semences de maïs, le rapport PEC/PNEC s'avère, comme pour le tournesol, préoccupant dans le cadre de la consommation de pollen par les nourrices, ce qui pourrait entraîner une mortalité accrue de celles-ci et être un des éléments de l'explication de l'affaiblissement des populations d'abeilles encore observé malgré l'interdiction du Gaucho® sur tournesol.

Enfin, étant donné que d'autres facteurs peuvent contribuer à l'affaiblissement des colonies d'abeilles, il convient que les recherches soient poursuivies sur la fréquence, les mécanismes et les causes de ces symptômes.

TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR L'ACQUISITION DES DONNEES  
AYANT FAIT DEFAUT AU COURS DE L'EVALUATION DES RISQUES

## 8. Recommandations

Ce chapitre traite : - des différents problèmes rencontrés lors de la validations des données (mauvais suivi d'échantillonnage, limite de détection et de quantifications trop élevées, protocoles d'études de toxicité non standardisés ...

- des données manquantes : dosages de résidus dans les différents produits de la ruche dont les principaux sont le miel, la bouillie larvaire et le pain d'abeille, données sur la stabilité de l'imidaclopride dans le pollen, nectar et miel au cours du stockage dans la ruche, données de toxicité sur les larves et nourrices.

Enfin certaines propositions sont faites afin de pallier les problèmes rencontrés. Ces propositions pourraient être également appliquées lors d'études concernant d'autres molécules phytosanitaires.

## 9. Travaux à réaliser pour compléter l'étude multifactorielle

Le rapport devra être progressivement enrichi des travaux futurs des membres du sous-groupe métrologie du CST. Il s'agira de :

- Réaliser une évaluation des risques du même type que celle effectuée pour l'imidaclopride, pour le fipronil
- Analyser les autres facteurs impliqués dans les pertes d'abeilles (maladies, pratiques apicoles et agricoles, variétés génétiques pour les plantes cultivées et traitées, influence des terpènes, ...) en étroite collaboration avec le sous-groupe réseau
- Faire l'inventaire des troubles des abeilles constatés dans les autres pays

## PREMIERE PARTIE: IMIDACLOPRIDE ET METABOLITES

### 1 LISTE DES RAPPORTS ET PUBLICATIONS RECENSEES SUR LES TROUBLES DES ABEILLES

Le travail de bibliographie s'est appuyé sur les documents réunis par le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales ainsi que sur les documents recherchés dans la littérature scientifique. La liste de ces documents est présentée en Annexe I, où sont différenciés les documents, rapports d'essais et articles de journaux de vulgarisation fournis par la Direction Générale de l'Alimentation (références Mxx) des publications issues de revues scientifiques à comité de lecture (références Axx) ainsi que des documents techniques (Txx).

Parmi ces documents, le Ministère a fourni 245 rapports d'études ou documents associés en rapport avec les troubles des abeilles. Parmi ceux ci 49 références portant sur l'imidaclopride ont été fournies par la société Bayer, 21 études fournies par les sociétés Bayer, Aventis et Rhone Poulenc portent sur le fipronil. Les études demandées par le Ministère à différents laboratoires publics depuis que le Gaucho a été mis en cause par les apiculteurs dans les disparitions d'abeilles représentent 58 références.

### 2 RAPPEL DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

Les principales caractéristiques de l'imidaclopride sont reprises ci dessous d'après les informations Agritox (<http://www.Inra.fr/agritox/fiches/867bayer.html>) et n'ont pas fait l'objet d'une étude de validation par le CST. Nous précisons qu'AGRITOX est une base de données sur les propriétés physico-chimiques, la toxicité, l'écotoxicité, le devenir dans l'environnement, les données réglementaires des substances actives phytopharmaceutiques autorisées en France. Cette base a été créée par le département de Phytopharmacie et d'Ecotoxicologie de l'INRA. 80 % des informations proviennent des dossiers toxicologiques de demande d'homologation déposés par les industriels au niveau français et européen, et 20 % sont de source bibliographique. Dans certains cas, les données présentées peuvent donc ne pas correspondre à la situation internationale. La fiche complète d'information est présentée dans l'annexe II, l'annexe III présente les structures chimiques de l'imidaclopride et de ses principaux métabolites.

#### 2.1 Identité

Substance active : imidaclopride,

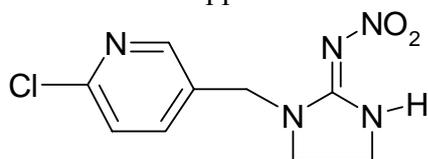
Activité(s) biologique(s) principale(s) : insecticide

Famille chimique : nitrométhylène ; Dénominations : imidaclopride

Noms chimiques : 1H-IMIDAZOL-2-AMINE, 1-[(6-CHLORO-3-PYRIDINYL) METHYL]-4,5-DIHYDRO-N-NITRO-

Formule brute : C<sub>9</sub> H<sub>10</sub> Cl N<sub>5</sub> O<sub>2</sub>

Formule développée :



Poids moléculaire: 255.66

Principaux métabolites : 5-hydroxyimidaclopride, 4-hydroxyimidaclopride, 4-5 hydroxyimidaclopride, oléfine, dérivé guanidine, dérivée urée, et acide 6 chloronicotinique

## 2.2 Propriétés physiques et chimiques

Etat physique : solide cristallisé

Tension de vapeur : 0,2  $\mu$ Pa à 20°C

Solubilité dans l'eau : 0,58 g/l à 20°C

Log P = 0,57 (21°C)

Stabilité dans l'eau : temps de demi-vie : 355 jour(s) au pH de 9 ; très stable au pH de 5 à 7 ; instable au pH de 10 à 14.

## 2.3 Comportement dans l'environnement

Persistance en plein champs : DT50 (en jours) : min : 79 ; max : 196

Photodégradation dans le sol DT50 (en jours) : 171 , source de lumière : naturelle ; type sol : inconnu, localisation : pays non connu, sol choisi par la firme

Adsorption et désorption (Koc et Kd) : Koc – min : 132 ; Koc max : 256

Valeurs réglementaires

Classement toxicologique : **Xn R22** (Décision de la Commission des Toxiques le 18/11/92)

Nocif (Xn) ; R22 nocif en cas d'ingestion

## 3 DONNEES D'EXPOSITION

Face au problème d'une éventuelle intoxication des abeilles par l'imidaclopride, il est nécessaire de déterminer les quantités de cette molécule auxquelles elles pourraient être exposées principalement par l'intermédiaire des pollens de tournesol, de maïs et du nectar de tournesol. Il convient ensuite d'évaluer les risques encourus.

Dosages de l'imidaclopride dans les produits récoltés par les abeilles

Une partie des études portant sur le dosage de l'imidaclopride dans le pollen et le nectar présentent des insuffisances. C'est pourquoi, nous ne pouvons valider que quelques résultats parmi tous ceux qui sont disponibles. Les données recueillies sont présentées de la façon suivante. L'ensemble des données disponibles sera décrit dans un premier paragraphe. Dans le deuxième paragraphe ne seront présentées que les données répondant à des critères de validation déterminés, qui seront retenues pour les étapes ultérieures. Enfin, un paragraphe sera dédié aux commentaires sus-cités et à l'exposé des perspectives. Cette présentation sera celle utilisée pour tous les types de données.

Généralement, les rapports en notre possession ne précisent pas si les teneurs en imidaclopride sont exprimées en  $\mu$ g/kg de poids frais ou de poids sec de pollen ou de nectar, lorsque cette information est connue, cela est précisé dans les tableaux..

### 3.1 Dosages dans le pollen

#### a) Résultats disponibles

De nombreux dosages de pollens ont été réalisés en utilisant des techniques variées.

Le Tableau I présente l'ensemble des résultats et précise :

- Les types de cultures traitées à l'imidaclopride (Plantes)
- Le nombre d'échantillons qui ont été dosés (Effectif)
- La limite de quantification en  $\mu$ g/kg (ppb) (LQ)
- La limite de détection en  $\mu$ g/kg (ppb) (LD)
- Les principaux résultats annoncés dans l'étude
- Les références bibliographiques
- Les laboratoires ayant effectués les analyses

- La technique de dosages utilisée

**Tableau I : Résultats annoncés<sup>§</sup> des dosages d'imidaclopride dans les pollens** (T = pollen de tournesol, Mt = pollen de maïs de trappes, Mf = pollen de maïs, C = pollen de colza ; ND = non détecté)

Plantes	Effectifs	LQ (ppb)	LD (ppb)	Résultats (ppb)	Références	Laboratoires	Technique de dosage de l'imidaclopride
T (+M)	64	10	?	<10 (n=46) ND (n=18)	M29 Bonmatin, 1998	CNRS/CBM	HPLC-MS
T	24	1	0,3	3 <0,3 (n=4) <1 (n=6) ≥1 (n=14)	M34* Bonmatin, 2001	CNRS/CBM	HPLC-MS/MS
T	2	5	1,5	ND	M10 Schmuck <i>et al.</i> , 1999	Bayer	HPLC-MS/MS
T	2	5	1,5	ND	M11 Schmuck <i>et al.</i> , 1999	Bayer	HPLC-MS/MS
T	14	2	1,5	<2 <1,5 (n=11) ≥2 (n=3)	M31 Lagarde, 2000	CETIOM	GC-MS/MS
T	5	?	?	13,3	M111 Laurent et Scalla, 2001	INRA	Radioactivité
T	2 (22 plants)			3,3	M5 Stork, 1999	Bayer	Radioactivité + CCM-2D + AMD
Mt	6	1	0,3	2	M34, M213* Bonmatin, 2001	CNRS/CBM	HPLC-MS/MS
Mt	14	1	0,43	< 0,4 (n=6) < 1 (n=2) ≥ 1 (n=6)	M210, M215* Bonmatin, 2002	CNRS/CBM	HPLC-MS/MS
Mf	12	1	0,25 et 0,3	3,3 < m < 3.7 < 1 (n=7) ≥ 1 (n=8)	M210, M215* Bonmatin, 2002	CNRS/CBM	HPLC-MS/MS
C	16 poolés en 4 (2 sites, 2 prélèvements par site/colonies (4))	1	0,3	< 1 (n=2, 1 site) ≥ 1 (n=2, 1 site)	M143 Scott-Dupree et Spivak, 2000	Universités de Guelph (Canada) et du Minnesota (USA)	HPLC-MS/MS
Mf	4 sites	5	0,15	<5	M147	Bayer	HPLC-MS/MS
Mf	1site	5	0,15	<0,15	M148	Bayer	HPLC-MS/MS

<sup>§</sup> Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

**Les études en blanc correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant.**

\*Pour les M34, M210, les résultats ne sont pas validés bien que les protocoles le soient, ce qui explique le blanchiment partiel du tableau. Les teneurs moyennes en imidaclopride données dans ces études ont été recalculées en éliminant les échantillons ne correspondant pas aux critères de validations établis par les membres du CST.

Les analyses concernent le pollen de fleurs de tournesol (M34, M29, M5, M31, M10, M11 et M111) et le pollen de maïs (M34, M210, M213, M215, M147, M148).

Les résultats de dosages concernant le pollen de fleurs de colza réalisés sur le continent américain sont reportés à titre indicatif (M143).

Les techniques HPLC-MS (M29) et HPLC-MS/MS (M10, M11, M34, M143, M147, M148 et M210) mesurent la teneur en imidaclopride seul. La technique de GC-MS/MS (M31) mesure la teneur en résidus totaux.

Les études effectuées avec des semences enrobées à l'imidaclopride marqué ( $^{14}\text{C}$ ) se font dans des conditions de semis particulières (M111 et M5).

Le dosage de la radioactivité totale ne donne également que la teneur en résidus totaux. Toutefois, Stork (1999, M5) a couplé cette détection avec une chromatographie sur couche mince en deux dimensions et la technique AMD. Ceci a permis d'observer que la radioactivité présente dans la partie solubilisée du pollen est sous forme d'imidaclopride seul.

Par ailleurs, les membres du CST souhaitent souligner la différence existant entre le pollen de trappe et le pollen de fleurs. Le pollen de trappe, récolté au sein même de la ruche, est le reflet de l'environnement de la colonie puisqu'il est constitué de l'ensemble des pelotes des différentes butineuses. Si la ruche est placée dans une zone de grande culture, le pollen de trappe sera homogène car constitué de pelotes en provenance de la même espèce végétale ayant reçu les mêmes traitements phytosanitaires. Si la ruche est placée dans un environnement hétérogène le pollen de trappe pourra être constitué de pelotes provenant d'espèces végétales différentes et/ou d'espèces identiques traitées ou non Gaucho. De ce fait, les quantités d'imidaclopride dosées dans les échantillons de pollen de trappe peuvent être sous estimées. Par ailleurs, la pose de trappe à pollen perturbant l'activité de la colonie, les dosages effectués à partir du pollen de trappe peuvent ne pas être représentatifs. Ils ne seront donc pas pris en compte lors de l'évaluation de l'exposition pour le calcul de risques.

#### b) Validité des résultats

Les critères de validation des résultats de dosages de pollen retenus par les membres du CST sont :

- N°1 : un nombre d'échantillons suffisant provenant de sites distincts. Dans certains cas (dosage de nectar) plusieurs expérimentations peuvent être regroupées à condition que les méthodes de prélèvements et dosages soient homogènes.
- N°2 : un historique complet et sans ambiguïté des échantillons et des méthodes d'échantillonnages selon le substrat étudié
- N°3 : des limites de quantification et de détection annoncées dans les études et suffisamment basses (LQ=1 ppb ; LD<0,5 ppb).
- N°4 : une méthode de dosage spécifique de l'imidaclopride et de ses métabolites afin de limiter les incertitudes lors de l'évaluation de risques (pas de dosages de résidus totaux),
- N°5 : un poids d'échantillon conforme au poids requis par la validation de la méthode,
- N°6 : des échantillons représentatifs des conditions naturelles environnementales.

Par ailleurs, la description des protocoles et les rapports d'études doivent être clairs et acceptables par les experts du CST. Le laboratoire CNRS/CBM a réalisé environ la moitié des études de dosages, certains des rapports soulevant des interrogations. C'est pourquoi un groupe d'experts du CST (Arnold, Declercq, Personeni, Rortais et Thybaud) s'est rendu à Orléans dans les laboratoires du CNRS/CBM (M. Bonmatin) et de Biotec Centre (laboratoire privé sous-traitant les analyses) afin d'obtenir des précisions sur les méthodes expérimentales, l'échantillonnage, la présentation et l'interprétation des résultats. Une liste des questions relatives aux méthodes et aux résultats avait été préalablement fournie aux laboratoires (Annexes IV et V).

Les principales conclusions de cette visite sont détaillées dans l'Annexe V et sont valables pour l'ensemble des dosages effectués (pollens, nectars, végétaux et sols). En particulier, les membres du CST ont fait remarquer que dans la plupart des rapports fournis, des informations manquent sur la nature exacte et l'historique des échantillons et/ou sur le nombre d'échantillons analysés pour un paramètre étudié. Les fiches de prélèvements correspondantes aux échantillons ont par la suite été transmises au CST.

Une amélioration de la méthode d'analyse entre 1998 et les études suivantes a également été notée.

\* ***Dosages dans les pollens de tournesol***

Malgré un grand nombre d'échantillons testés (n=64), les résultats de l'étude du laboratoire CNRS/CBM (1998, M29) n'ont pas été validés en raison de l'incertitude qui pèse sur le type de pollen et en raison de la méthode utilisée en 1998 qui n'était pas assez spécifique et conduisait à une LQ élevée (10 ppb) (Annexe VI)

La méthode HPLC–MS/MS développée à partir de 1999 remplit les critères de spécificité et permet la quantification de faibles teneurs (LQ = 1 ppb). Ceci permet de valider les dosages de pollens de tournesol (M34) effectués à Biotec Centre (Annexe VII). Néanmoins, même si l'étude correspondante (M34) est validée, nous ne pouvons accepter ses conclusions telles quelles. En effet, les calculs des teneurs moyennes d'imidaclopride dans les pollens prennent en compte des échantillons de pollen de trappe (n=20), un échantillon d'anthères de tournesol et des échantillons de nature inconnue (n=3). Dans un souci de précision, il nous a donc paru nécessaire de ne considérer que les pollens de trappe. Les teneurs moyennes d'imidaclopride calculées et la répartition des 20 échantillons en fonction de leurs teneurs en pesticide sont indiquées dans le Tableau II.

**Tableau II : Résultats des dosages d'imidaclopride validés<sup>s</sup> dans les pollens de tournesol traité Gaucho**

Type d'échantillon	Effectif	Teneur en imidaclopride (ppb) <sup>1</sup>	Répartition
<b>Pollen de trappe sur zone Tournesol traitée Gaucho</b> (Bonmatin, 2001, M34)	20	<b>2,1 &lt; m &lt; 2,3</b> médiane = 1,6 90 <sup>ème</sup> percentile = 3,9 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5	
<b>Pollen de fleurs de tournesol</b> (Stork, 1999, M5)	2 (22 plants)	<b>3,3 &lt; m &lt; 3,4</b> -	-

- : calcul et répartition impossible en raison du pool des données ; <sup>s</sup> Les résultats de ce tableau sont calculés en faisant abstraction des échantillons présentant un manque d'informations, des ambiguïtés. Les échantillons validés et utilisés pour ces calculs apparaissent en blanc dans l'Annexe VII.

La concentration moyenne d'imidaclopride contenu dans le pollen de trappe sur zone tournesol traitée Gaucho se situe entre 2,1 et 2,3 ppb, la médiane est de 1,6 ppb.

<sup>1</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3 ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride < LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2 , pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations.

Sur les 20 échantillons analysés, deux ont une valeur inférieure à la limite de détection (LD = 0,3 ppb), cinq ont une valeur inférieure à la limite de quantification (LQ = 1 ppb), et 13 ont une valeur supérieure à cette limite.

L'étude de Stork (1999, M5), utilisant la méthode de la radioactivité couplée à une CCM-2D et AMD, présente un nombre d'échantillons (n=22 échantillons poolés en 2 lots) et des conditions de cultures acceptables (semis en pots en février), le volume par plant (1300 cm<sup>3</sup>) est comparable à une situation en champs (1300cm<sup>3</sup>). Elle est par conséquent validée. Les échantillons dosés concernent des échantillons de pollens de fleurs de tournesol traité Gaucho, la teneur moyenne est de 3,3 ppb. Aucun métabolite n'a été détecté dans cette étude.

L'étude de Lagarde (2000, M31) présente une analyse en résidus totaux et non pas en imidaclopride seul. Cependant, les résultats convergent avec ceux de Bonmatin (2001, M34), apportent du crédit à l'ensemble de ces analyses.

Les études réalisées par Schmuck *et al.* (1999, M10 et M11) et celles réalisées par Laurent et Scalla (2001, M111) ne sont pas validées en raison d'un faible nombre d'échantillons, d'une LQ élevée (LQ=5 ppb pour M10 et M11) ou indéterminée (M111), et de conditions de culture du tournesol non optimales (semis en juillet et récolte en octobre, mauvaise pousse des végétaux) (M111).

#### \* Dosages dans les pollens de maïs

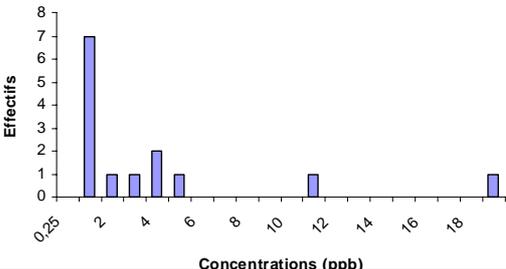
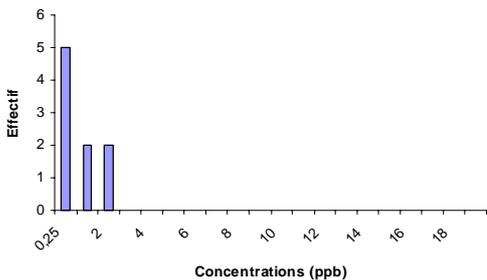
Pour les dosages concernant le pollen de maïs, deux campagnes d'échantillonnages (1998-1999 ; 2000) donnant lieu à 2 séries d'analyses par Biotec Centre et aboutissant respectivement aux études M34 (Bonmatin, 2001) et M210 (Bonmatin, 2002) ont été menées. Lors de l'étude M34, 10 échantillons ont été prélevés dont 6 échantillons de pollens de trappe sur zone maïs traité Gaucho, 2 échantillons de panicules de maïs traité Gaucho et 2 échantillons de nature inconnue (Annexe VII). Des incertitudes concernant la nature et les traitements appliqués ont été relevés d'après les fiches de prélèvements. Le nombre d'échantillons sans ambiguïté est alors trop faible (n=3 pour le pollen de trappe, n=2 pour le pollen de panicule), l'étude correspondante (M34) n'est donc pas validée en ce qui concerne les dosages d'imidaclopride dans les pollens de maïs.

En revanche, l'étude M210 (Bonmatin, 2002 ; Annexe VIII), se base majoritairement sur des échantillons prélevés par Testapi et présentant une bonne traçabilité. Néanmoins, un certain nombre des échantillons présentés dans ce rapport M210 sont des échantillons testés et prélevés en 1998 (étude M34), puis à nouveau analysés en 2000. Compte tenu des ambiguïtés précédemment citées avec ces échantillons, nous ne les prendrons pas en compte dans la suite de l'évaluation.

La méthode d'analyse de l'étude M210 respecte les critères établis par les membres du CST. Cette étude est donc validée sous réserve de ne prendre en compte que les échantillons prélevés par Testapi et d'exclure les échantillons en provenance de l'étude M34. Les échantillons pris en compte sont soit des échantillons de pollen de trappe soit des échantillons de pollens de panicules, leur descriptif est répertorié dans l'Annexe VIII.

Les teneurs moyennes calculées et les répartitions des échantillons sélectionnées sont indiquées dans le Tableau III.

**Tableau III : Résultats des dosages validés<sup>s</sup> d'imidaclopride dans les pollens de maïs**

Type de pollen	Effectif	Teneur en imidaclopride (ppb) <sup>2</sup>	Répartition
Pollen de panicule de maïs traité Gaucho (Bonmatin, 2002 ; M210)	15	<b>3,28 &lt; m &lt; 3,65</b> médiane=1,2 90 <sup>ème</sup> percentile=8,55 10 <sup>ème</sup> percentile=0,5	
Pollen de trappe sur zone maïs traitée Gaucho (Bonmatin, 2002 ; M210)	9	<b>0,69 &lt; m &lt; 0,81</b> médiane=0,215 90 <sup>ème</sup> percentile=1,36 10 <sup>ème</sup> percentile=0,215	

<sup>s</sup> Les résultats de ce tableau sont calculés en faisant abstraction des échantillons présentant un manque d'informations, des ambiguïtés. Les échantillons validés et utilisés pour ces calculs apparaissent en blanc dans l'Annexe VIII.

Il n'a pas été possible de conclure quant à la présence d'imidaclopride dans le pollen de maïs issu d'une culture traitée Gaucho l'année précédant le prélèvement et non traitée l'année du prélèvement, le nombre d'échantillons validés étant trop faible (n=1 pour le pollen de fleurs, n=0 pour le pollen de trappe).

En ce qui concerne les études M147 et M148 (Bayer), il s'agit d'études préliminaires au dossier d'homologation du Gaucho, la limite de quantification étant de 5ppb, ces études ne sont pas validées. Par ailleurs, nous n'avons aucune indication concernant le nombre d'échantillons, leurs poids etc.

#### \* Dosages dans les pollens de colza

L'étude M143 (Scott-Dupree et al, 2000) fait référence à des dosages de pollen de trappe sur zone Colza traité Gaucho. L'étude se déroule aux Etats-Unis où l'enrobage de semences de Colza est autorisé. Ce traitement n'est pas homologué en France. Deux prélèvements par ruche sur chacun des 2 sites ont été effectués. Les prélèvements des 4 ruches ont ensuite été poolés. A l'instar de l'étude de Stork (M5, 1999), nous considérons comme satisfaisant le nombre d'échantillons. Les limites de quantification et de détection sont respectivement de 1

<sup>2</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3 ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride < LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2 , pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations.

et 0,3 ppb. Cette étude est donc validée. On notera cependant que cette étude fait référence à un colza canadien de printemps qui ne peut être comparé au colza d'hiver cultivé en France.

**Tableau IV : Résultats des dosages validés d'imidaclopride et de ses métabolites dans les pollens de Colza (enrobage Gaucho des semences non homologué en France)**

Type d'échantillons	Effectif	Substance dosée	Teneur en imidaclopride <sup>3</sup> (ppb)	Répartition
Pollen de trappe sur zone Colza enrobée Gaucho (Scott-Dupree & Spivak, 2000, M143)	16	Imidaclopride	<b>3,15&lt;m&lt;3,5</b> mediane=2,45 90 <sup>ème</sup> percentile = 6,64 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5	-
		Olefine Hydroxyimidaclopride	<LQ (1)	

- la répartition des échantillons selon leurs teneurs substances actives n'a pas été présentée en raison du pool des échantillons menant à 4 données brutes.

### c) Commentaires et perspectives

La validation des données issues des rapports du laboratoire CNRS/CBM permet de conclure que les niveaux de résidus d'imidaclopride contenus dans les pollens de trappe sur zone tournesol traité Gaucho se situent entre 2,1 et 2,3 ppb. Pour les pollens prélevés sur la fleur de tournesol traité Gaucho, l'étude de Stork donne une teneur en imidaclopride de 3,3 ppb.

Pour les pollens de panicules de maïs traité Gaucho, nous concluons à des teneurs en imidaclopride entre 3,28 et 3,65 ppb. Des scénarios d'intoxication par voie topique et orale doivent être envisagés pour le pollen de maïs.

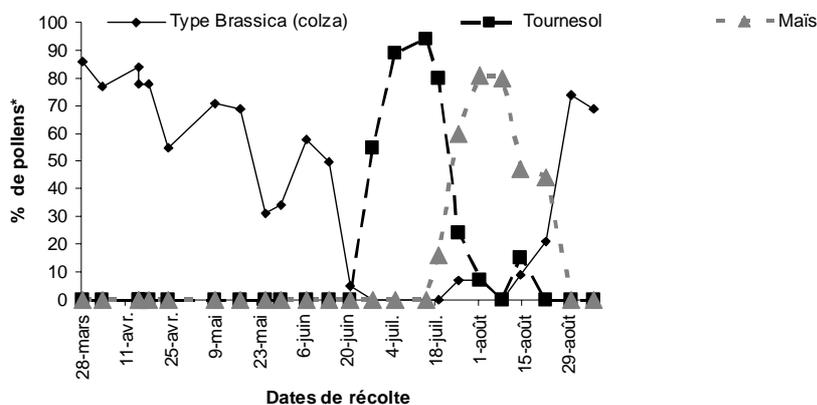
En ce qui concerne le pollen de maïs, les analyses réalisées sur pollen de trappe sur zone maïs traité Gaucho montrent, dans les conditions de l'expérience, des résidus d'imidaclopride entre 0,69 et 0,81 ppb.

Les analyses de pollens de trappe sur zone Colza traité Gaucho montrent des teneurs moyennes en imidaclopride similaires à celles contenues dans les pollens de trappe sur zone Tournesol, à savoir 3,15 à 3,5 ppb.

Il semble donc exister une différence entre les pollens de trappe sur zone maïs et ceux sur zone Tournesol et Colza. Néanmoins, les pollens de trappe sont constitués d'un mélange de pollens en provenance de plusieurs espèces de fleurs traitées ou non Gaucho. Ainsi les différences de concentrations en imidaclopride observées entre les pollens de trappe pourraient s'expliquer par une prépondérance du butinage du tournesol tandis que le maïs serait moins attractif, le pollen de maïs serait alors dilué dans d'autres pollens de fleurs non nécessairement traitées Gaucho. Les travaux de l'unité de Zoologie de l'INRA Le Magneraud (Odoux et al, M159) confirment cette hypothèse. La Figure 1 montre une superposition de la présence des pollens de tournesol et de maïs dans la 2<sup>ème</sup> quinzaine de juillet.

<sup>3</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3 ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride <LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2 , pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations.

**Figure 1 : analyses polliniques de pelotes d'abeilles récoltées en trappe (d'après Odoux et al, 2003 ; M159):**



\* : les pourcentages de pollens sont exprimés en fonction du % volumique des pollens totaux

Par ailleurs, nous ne pouvons que déplorer le fait, qu'aucune étude concernant les niveaux de résidus des métabolites de l'imidaclopride contenus dans les pollens de tournesol et maïs n'ait pu être validée. Les métabolites montrent une toxicité certaine pour les abeilles, en particulier l'oléfine (cf. paragraphe 4). De même, en raison d'un mauvais suivi de l'échantillonnage, aucune conclusion n'a pu être donnée concernant la présence d'imidaclopride dans le pollen de trappe sur zone tournesol ou maïs suite à un traitement Gaucho la ou les années précédant le prélèvement.

Le CST préconise qu'à l'avenir, les prélèvements soient réalisés selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Il sera également nécessaire que les laboratoires soient capables de doser les métabolites de l'imidaclopride (hydroxyimidaclopride, oléfine, dihydroxyimidaclopride, dérivé urée, dérivé guanidine) avec des limites de quantification et de détection suffisamment basses (<1ppb)

### 3.1.1 Dosages dans le nectar

#### a) Résultats disponibles

Avec les mêmes techniques que pour l'analyse de pollen, l'imidaclopride a également été dosé dans les nectars de tournesol (M28, M37, M10, M11, M31, M5) et de colza (M143). L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau V.

**Tableau V : Résultats annoncés<sup>s</sup> des dosages de l'imidaclopride dans le nectar**

(T = tournesol C = colza, ND = non détecté)

Plantes	Effectifs	LQ (ppb)	LD (ppb)	Moyennes (ppb)	Références	Laboratoires	Technique de dosage de l'imidaclopride
T	38	10	?	<10 (n=8) ND (n=30)	M28 Bonmatin, 1998	CNRS/CBM	HPLC-MS
T	2	10	4,2	<4,2	M37 Bonmatin, 2001	CNRS/CBM	HPLC-MS/MS
T	1	5	1,5	ND	M10 Schmuck <i>et al.</i> , 1999	Bayer	HPLC-MS/MS
T	1	5	1,5	ND	M11 Schmuck <i>et al.</i> , 1999	Bayer	HPLC-MS/MS
T	4	1	0,8	1,6 (n=1) <0,8 (n=3)	M31 Lagarde, 2000	CETIOM	GC-MS/MS
T	2 (22 plants)			1,9	M5 Stork, 1999	Bayer	Radioactivité + CCM-2D + AMD
C	4 (2 sites, 2 prélèvements par site)	1	0,3	<1 (n=4)	M143* Scott-Dupree et Spivak, 2000	Universités de Guelph (Canada) et du Minnesota (USA)	HPLC-MS/MS

<sup>s</sup> Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.\* L'étude a été menée aux Etats-Unis ou l'enrobage Gaucho de semences de Colza est homologué contrairement à la France. Les études en blanc correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant

A noter que la matrice étant différente, les techniques d'extraction n'ont pas conduit à une LQ aussi faible que pour le pollen (M28 et M37) dans le cas des études réalisées par la société Biotec pour le laboratoire CNRS/CBM. Néanmoins un laboratoire (Université de Guelph et du Minnesota) parvient à obtenir des limites de quantifications et détection pertinentes.

#### b) Validité des résultats

Les critères de validation sont identiques à ceux utilisés pour les dosages d'imidaclopride dans les pollens.

Malgré un grand nombre d'échantillons, les dosages de nectar prélevé dans les ruches pilotés par le laboratoire CNRS/CBM en 1998 (M28) ne sont pas validés pour les mêmes raisons que pour les dosages de pollens de 1998 (méthode pas assez spécifique, LQ élevée). En 2001, ce laboratoire n'a testé que deux échantillons de nectar provenant de tournesol traité Gaucho, ces échantillons étaient de masse inférieure à celle requise par la technique (M37) ; ces résultats ne sont donc pas acceptés.

De même que pour les dosages de pollens, les études de Schmuck (M10 et M11) présentent une LQ trop élevée (5ppb). L'étude de Lagarde (M31) se base sur un petit nombre d'échantillons (n = 4) et ne donne que la teneur en résidus totaux. Compte tenu de ces insuffisances, ces études ne peuvent pas être validées.

L'étude de Stork (M5) se base sur un nombre satisfaisant d'échantillons (11 échantillons poolés en 2 lots). Par conséquent nous validons cette étude ainsi que la teneur de 1,9 ppb d'imidaclopride dans le nectar de tournesol (le calcul de la médiane n'est pas réalisable en raison de l'absence des données brutes).

Dans le nectar de Colza traité Gaucho (non homologué en France), nous validons l'étude M143 (cf Tableau VI) concernant le dosage d'imidaclopride et de 2 de ses métabolites.

**Tableau VI: Résultats des dosages validés d'imidaclopride et de ses métabolites dans le nectar de Colza\***

Type d'échantillons	Effectif	Substance dosée	Teneur en imidaclopride <sup>1</sup> (ppb)	Répartition
Nectar de Colza enrobé Gaucho (Scott-Dupree & Spivak, 2000, M143)	16	Imidaclopride	<b>0,5&lt;m&lt;0,85</b> mediane=0,55 90 <sup>ème</sup> percentile = 0,74 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5	-
		Oléfine Hydroxyimidaclopride	<b>&lt;LQ(1)</b>	

- la répartition n'a pas été présentée en raison du pool des échantillons menant à 4 données brutes. \* L'étude a été menée aux Etats-Unis ou l'enrobage Gaucho de semences de Colza est homologué contrairement à la France

### c) Commentaires et perspectives

Il est nécessaire de prévoir de nouveaux prélèvements (BPL) et dosages, et en priorité de trouver un ou plusieurs laboratoires susceptibles de doser l'imidaclopride seul dans des nectars en tenant compte de la spécificité de la matrice et de la difficulté à en obtenir en quantité élevée. Une dérogation pour mettre en culture du tournesol traité Gaucho sous condition d'encapuchonner les capitules de tournesol afin d'éviter tout contact avec les abeilles doit être préalablement obtenue.

*Par ailleurs, il serait utile de conduire des dosages de l'imidaclopride dans le miel afin d'évaluer son devenir au cours de la transformation du nectar en miel ainsi que dans le miel stocké.*

## 3.2 Dosages de l'imidaclopride dans les sols et rémanence

### a) Résultats disponibles

Dans les études de laboratoire effectuées dans le cadre du dossier d'autorisation de mise sur le marché de l'imidaclopride, la demi-vie de cette substance est de 188±25 jours sur sol sableux-limoneux et de 249±50 jours sur sol limoneux ultra-fin (M22). Sa capacité d'adsorption dans le sol est faible (constante d'adsorption de 1,17 à 3,59), en revanche l'imidaclopride est très photosensible (M22). En plein champ (M76), la demi-vie est de 140±41 jours sur sols nus (n=10), et deux études sur sols cultivés donnent une demi-vie de 102 et 125 jours. A noter que pour cette étude nous ne disposons que des résultats bruts. Cette molécule est donc persistante au sens réglementaire. Une note de l'agence de réglementation de la lutte anti-parasitaire du Canada (M255) annonce une demi-vie supérieure (1 à 2 ans) dans des conditions de culture aux champs mais nous ne disposons pas des résultats correspondants. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que dans la zone de production colza, les sols restent gelés ou très froids donc avec peu d'activité microbienne pouvant dégrader l'imidaclopride, durant une grande partie de l'année. Des dosages de sols ont également été entrepris sur des parcelles ayant ou non été traitées à l'imidaclopride les années précédentes. Ces dosages ont été effectués d'une part par la société Bayer pour des prélèvements réalisés avant semis à l'année A, et d'autre part, par le laboratoire CNRS/CBM et la société Biotec-Centre pour des prélèvements réalisés après culture à l'année A. Les résultats et l'historique des échantillons sont présentés dans le Tableau VII. Les rapports en notre possession ne précisent pas si les teneurs en imidaclopride ont exprimées en µg/kg de poids frais ou de poids sec de sols.

**Tableau VII : Dosages annoncés<sup>S</sup> de l'imidaclopride dans les sols**

Rapport	Méthode	Antécédents Imidaclopride*	Effectif (n)	Type de sol	Imidaclopride (µg/kg)	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
M10 Schmuck et al., 1999 Site LaacherHof <sup>¶</sup>	HPLC-MS-MS (rapport ion mère/ion fille sans NO <sub>2</sub> )	Pas de traitement imidaclopride à A, A-1, A-2, A-3	2	Sable limoneux	<LD	2	6
		Imidaclopride à A-1,5	1		15,7		
		Imidaclopride à A-0,5	1		12,7		
		Imidaclopride à A-1 et A-0,5	1		14,3		
M11 Schmuck et al., 1999 Site Höfchen <sup>¶</sup>	HPLC-MS-MS (rapport ion mère/ion fille sans NO <sub>2</sub> )	Pas de traitement imidaclopride à A, A-1, A-2, A-3	2	Limon argileux	<LD	2	6
		Imidaclopride à A-1,5 et A	1		18		
		Imidaclopride à A-0,5	1		<LQ		
M19, M21, M150 Bonmatin, 2000-2001 <sup>¶</sup>	HPLC-MS-MS (rapport ion mère sans NO <sub>2</sub> /ion fille sans NO <sub>2</sub> et sans Cl)	Cultures biologiques	6	Non renseigné	<LD m=10	0,13	1
		Juste après culture imidaclopride	10		Max = 21,9 <LQ (n=1) >LQ (n=9) m<LQ max = 1,5		
		Juste après culture non imidaclopride, pas d'antécédent à A-1 et A-2	10		<LD (n=3) <LQ (n=6) >LQ (n=1)		
		Juste après culture non imidaclopride, antécédent imidaclopride à A-1 et pas à A-2	22		Max = 15,2 <LQ (n=6) >LQ (n=16)		
		Juste après culture non imidaclopride, antécédent imidaclopride à A-1 et A-2	8		Max = 22 <LD (n=2) >LQ (n=6)		
		M137 Placke, 1998	HPLC-Détection UV	Après pulvérisation d'imidaclopride (Confidor) sur sols plantés de pommiers, suivi 5ans, plusieurs relevés dans l'année	3 x 32	Limoneux Sableux Crayeux	5,6 8,4 13,7 <sup>‡</sup>
M138 Placke, 1994	HPLC-Détection UV	Après pulvérisation (Zelmone) d'imidaclopride sur sols plantés de laitue ou navets	1 échantillon/mois sur 6 mois		20 à 36	2	6

<sup>S</sup> Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études. **Les études en blanc correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant**

\*Pour les M19, M21, les résultats ne sont pas validés bien que les protocoles le soient, ce qui explique le blanchiment partiel du tableau. Les teneurs moyennes en imidaclopride données dans ces études ont été recalculées en éliminant les échantillons ne correspondant pas aux critères de validations établis par les membres du CST.\* A correspond à l'année du prélèvement, A-1 à l'année précédente, etc. <sup>¶</sup> Dans les études M10, M11, M137 et M138 les échantillons analysés proviennent de carottes de 5 cm de diamètre et de 30 cm de profondeur homogénéisées. Cette information n'est pas connue pour les échantillons de l'étude M19. <sup>‡</sup> Les valeurs annoncées correspondent aux résultats des dosages après 5 ans de traitement imidaclopride.

## b) Validité des résultats

Les critères de validation sont identiques à ceux déterminés pour les dosages dans le pollen.

La technique de dosage utilisée pour ces études est l'HPLC-MS/MS, décrite précédemment comme la plus spécifique et la plus sensible pour les dosages de l'imidaclopride seul. L'audit effectué auprès de M Bonmatin (laboratoire CNRS/CBM) a permis de valider cette technique ainsi que les limites de détection et de quantification décrites pour l'étude 1999-2000 (M19, M21, M150).

Il a été difficile d'obtenir l'historique des échantillons de sols prélevés pour les analyses du laboratoire CNRS/CBM. D'une façon générale, les fiches de prélèvements (M211) fournies postérieurement ont permis une amélioration de la connaissance des échantillons. Les informations données par ces fiches ont souvent pu être complétées par celles données par les fiches de prélèvements des végétaux (M212) lorsque sols et végétaux ont été prélevés sur le même site. L'Annexe IX présente l'ensemble des résultats des échantillons individuels avec les antécédents connus en traitements Gaucho ou non et les différentes cultures. On notera cependant qu'il existe des ambiguïtés concernant l'historique des échantillons. Néanmoins, la technique de dosage de l'imidaclopride utilisée dans cette étude est conforme aux critères de validation déterminés par le CST, l'étude est donc validée même si les conclusions en découlant sont remises en questions. En ne prenant en compte que les échantillons dont l'historique et la nature sont connus de manière certaine, nous obtenons les teneurs moyennes en imidaclopride et répartitions des échantillons suivantes (Tableau VIII) :

**Tableau VIII : Résultats des dosages validés<sup>5</sup> d'imidaclopride dans les sols à cultures de tournesol**

Type d'échantillon	Effectif	Teneur en imidaclopride <sup>4</sup> (ppb)	Répartition
Sols de cultures traitées Gaucho l'année du prélèvement	8	<b>10,2 &lt; m &lt; 10,3</b> médiane = 7,45 90 <sup>ème</sup> percentile = 20,18 10 <sup>ème</sup> percentile = 1,5	
Sols de cultures non traitées Gaucho l'année du prélèvement mais avec antécédent Gaucho à A-1	28	<b>4,29 &lt; m &lt; 4,48</b> médiane = 2,35 90 <sup>ème</sup> percentile = 12,75 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5	

<sup>5</sup> Les résultats de ce tableau sont calculés en faisant abstraction des échantillons présentant un manque d'informations, des ambiguïtés.

Les échantillons validés et utilisés pour ces calculs apparaissent en blanc dans l'Annexe IX

<sup>4</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride < LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2 , pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations

En conclusion:

- Juste après une culture traitée à l'imidaclopride, on retrouve toujours la molécule à une teneur moyenne de 10,2 à 10,3 ppb (n=8).
- 1 an après le dernier traitement à l'imidaclopride, la teneur moyenne présente dans les sols est de 4,3 à 4,5 ppb.

Nous soulignons que ces deux conclusions sont conformes à celles émises par l'auteur de cette étude. Cependant les conclusions concernant les phénomènes d'accumulation suite à plusieurs traitements Gaucho consécutifs et l'influence de la culture en cours ne sont pas validées en raison du nombre trop faible d'échantillons. En effet, dans cette étude, seuls 8 échantillons ont été prélevés sur sol ayant reçu des semences enrobées Gaucho 2 années consécutives (Annexe IX). Les conclusions concernant l'influence de la culture en cours sont basées sur 4 échantillons pour le maïs et 6 pour le tournesol

Les études de Schmuck *et al.* (1999, M10 et M11) ne présentent qu'un faible nombre d'échantillons et une LQ élevée et ne peuvent donc être validées. Cependant, les résultats obtenus confortent ceux des rapports M19 et M21 (Bonmatin, 2000, 2001).

Les études M137-M138 (Placke, 1994, 1998) réalisées par Bayer présentent le devenir de l'imidaclopride dans les sols et l'éventuel transfert dans les cultures suivantes. Elles présentent respectivement une détermination du comportement de l'imidaclopride dans les sols pendant 6 années consécutives d'application de Confidor et un suivi de 6 mois des teneurs en imidaclopride dans les sols lors de cultures en rotation (application de Zelmone). L'étude M137 conclut à une augmentation de la teneur en imidaclopride dans les sols durant les 3 premières années puis à l'obtention d'un plateau. On notera également une variabilité de la capacité de dégradation selon le type de sols.

L'étude M138, conclut à une diminution de 50% de la quantité d'imidaclopride dans les sols au bout de 6 mois

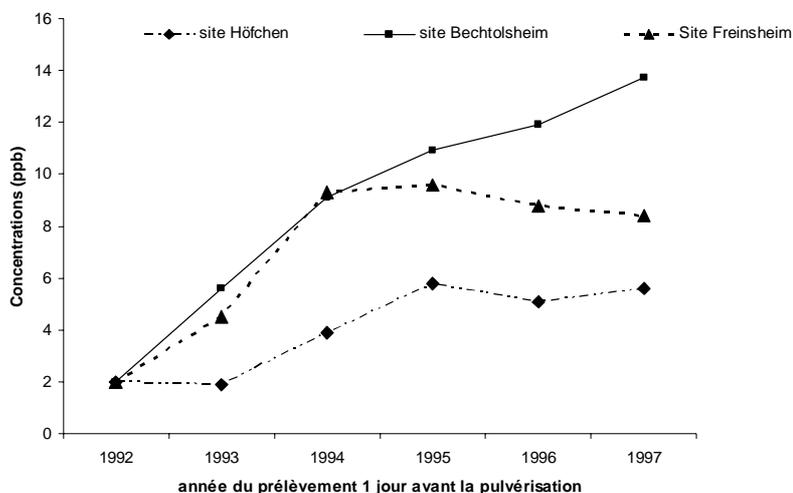
Malgré l'intérêt de ces études, nous ne les retiendrons pas dans notre évaluation en raison de la spécificité des traitements qui ne correspondent pas à notre cas de semences enrobées Gaucho.

### c) Commentaires et perspectives

L'intérêt d'analyser les teneurs en imidaclopride dans les sols serait d'évaluer la quantité de résidus susceptibles d'être absorbés par les plantes au cours des années ultérieures. Dans les conditions de semences enrobées Gaucho, seule l'étude du laboratoire CNRS/CBM (Bonmatin, 2001, M21) nous a permis d'estimer une diminution de 50% des teneurs en imidaclopride résiduel dans les sols l'année suivant un traitement. Il n'est malheureusement pas possible de conclure sur plusieurs années consécutives en raison du faible nombre d'échantillons.

Néanmoins, dans le cas particulier de pulvérisations successives d'imidaclopride sur sols, la Figure 2, obtenue à partir des résultats des études de Placke (M137, M138), semble montrer des phénomènes d'accumulation au cours des années. La quantité d'imidaclopride présente dans les sols augmente au cours des 3 premières années puis se stabilise dans 2 sites sur 3.

**Figure 2 : Teneur en imidaclopride dans les sols le jour précédant\* un début de traitement annuel (3 pulvérisations min /an) au Confidor (d'après Placke, 1998 ; M137).**



\* La teneur en imidaclopride dans les sols en début de traitement n'a pas été déterminée. La teneur de 1992 a été arbitrairement choisie comme étant la limite de détection, le sol n'ayant jamais reçu de traitement à l'imidaclopride au cours des années précédentes.

*Ces phénomènes d'accumulations lors de traitements Gaucho consécutifs méritent d'être à nouveau étudiés dans le cas précis de semences de tournesol et maïs traités Gaucho en portant un soin particulier au suivi de l'échantillonnage.*

### 3.3 Devenir de l'imidaclopride dans la plante

#### a) Résultats disponibles

##### \* Tournesol

De nombreuses études utilisant les techniques déjà présentées pour les dosages des pollens ont conduit à l'évaluation des teneurs en imidaclopride dans le tournesol traité Gaucho ou le tournesol non traité Gaucho mais planté sur un site avec antécédent Gaucho. Elles ont été réalisées par le laboratoire CNRS/CBM et la société Biotec (M30, M17, M21 et M150), par la société Bayer (M10 et M11), par le CETIOM (M31) et par l'INRA de Toulouse (M111).

L'ensemble des résultats est réuni dans le Tableau IX. L'annexe X explicite les codes utilisés pour les stades de croissance. Pour la majorité des études, les rapports en notre possession ne précisent pas si les teneurs en imidaclopride sont exprimées en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids frais ou de poids sec de plantes. Lorsque cette information est connue, cela est précisé dans le tableau.

Il existe une grande hétérogénéité concernant les conditions de culture, les parties de la plante analysées, les stades de croissance auxquels les prélèvements ont été faits, ainsi que les limites de quantification des différents protocoles. Il est donc difficile de comparer ces études les unes avec les autres.

##### \* Plantes autres que Tournesol

Le laboratoire CNRS/CBM s'est aussi intéressé au dosage de l'imidaclopride dans le maïs traité Gaucho ou dans des cultures non traitées comme le maïs, le blé, le colza, la luzerne semées sur des champs ayant été traités antérieurement à l'imidaclopride (2000, M17, M21, M150 ; 2002, M209, M212, M214) (voir Tableau X).

**Tableau IX : Dosages annoncés<sup>§</sup> de l'imidaclopride dans le Tournesol**

Rapport	Méthode	Culture	Antécédents imidaclopride*	Type d'échantillons	Stade de croissance <sup>‡</sup>	n	Imidaclopride (µg/kg)	LD	LQ	
M30 Bonmatin, 1998	HPLC-MS	T Gaucho	-	feuilles	divers	116	max = 20 <LQ (n=107) >LQ (n=7)		0	
				capitules	divers	16	<LQ			
M17, M21 et M150 Bonmatin, 2000	HPLC- MS/MS	T Gaucho	-	divers	divers	26	m=4,3 max=9,1 LQ (n=26)	0,14	1	
		T non Gaucho	Antécédent à A-1	divers	divers	59	<LD (n=40) <LQ (n=6) >LQ (n=13)			
M10 Schmuck et al, 1999	HPLC- MS/MS	T Gaucho	Pas d'antécédent A, A-1, A-2, A-3	Feuilles supérieures	Pic floraison	1	6	1,5	5	
				flours		1	<LD			
		Tnon Gaucho	Antécédents de A-0,5 à A-1,5	Feuilles supérieures	Pic floraison	3	<LD			
				flours		3	<LD			
M31 Lagarde, 2000 Etude T99GSP <sup>‡</sup>	GC-MS/MS	T Gaucho	Antécédents A-1 ; A-1 et A-2 ou A-1, A-2 et A-3	Plante entière	B6 à B8	6	381±223	1	5	
				Feuilles sous capitules	F1 à F2	7	39±19			
				Pas d'antécédent A, A-1, A-2, A-3	Plante entière	B2 à B10	7			460±211
					Feuilles sous capitule	F1 à F2	7			32±18
		T non Gaucho	Antécédents A-1 ; A-1 et A-2 ou A-1, A-2 et A-3	Plante entière	B4 à B8	8	9,7±2,5 <LQ (n=1) >LQ (n=7)			
				Feuilles sous capitule	F1 à F2	7	<LQ (n=5) >LQ (n=2)			
M31 Lagarde, 2000 Etude T99GER <sup>‡</sup>	GC-MS/MS	T non Gaucho	Antécédents A-1 ; A-1 et A-2 ou A-1, A-2 et A-3	Plante entière	B6-B10	20	11,5±4,6 <LQ (n=1) >LQ (n=18) (+ 1 éch à 55 µg/kg)	1	5	

<sup>§</sup> Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

**Les études en blanc correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant**

\*Pour les M17, M21, les résultats ne sont pas validés bien que les protocoles le soient, ce qui explique le blanchiment partiel du tableau. Les teneurs moyennes en imidaclopride données dans ces études ont été recalculées en éliminant les échantillons ne correspondant pas aux critères de validations établis par les membres du CST.\* A correspond à l'année du prélèvement, A-1 à l'année précédente, etc. <sup>‡</sup> Les teneurs sont exprimées en µg/kg de poids frais.

<sup>‡</sup> voir Annexe X.

**Tableau IX (suite): Dosages annoncés<sup>§</sup> de l'imidaclopride dans le Tournesol**

Rapport	Méthode	Culture	Antécédents imidaclopride*	Type d'échantillon	Stade de croissance <sup>£</sup>	n	Imidaclopride (µg/kg)	LD	LQ		
M111 Laurent et Scalla, 2000 <sup>¥</sup>	Radioactivité	T enrobé 14C imid. Culture en pot	non	Cotylédon	B4	4	270000				
				Racines		4	560				
				Feuilles Inférieures		4	5700				
				Feuilles supérieures		4	300				
				tiges		4	100 à 500				
		T enrobé 14C imid. En champs après semis en pot	non	Feuilles					2880		
				Tiges	B4	5	130				
				Feuilles inférieures	B4	5	2757				
				Feuilles supérieures		5	143				
				Tiges inférieures	E4	5	76				
				Tiges supérieures	E4	5	14				
				Dos capitules		5	33				
				Plateau floral		5	9,5				
				Feuilles supérieures		5	521				
				Tiges supérieures	F	5	1				
				Dos capitule	F	5	4				
				Involucre	F	5	22				
Réceptacle	F	5	14								
gaine	F	5	27								

<sup>§</sup> Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

**Les études en blanc correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant**

\*Pour les M17, M21, les résultats ne sont pas validés bien que les protocoles le soient, ce qui explique le blanchiment partiel du tableau. Les teneurs moyennes en imidaclopride données dans ces études ont été recalculées en éliminant les échantillons ne correspondant pas aux critères de validations établis par les membres du CST.\* A correspond à l'année du prélèvement, A-1 à l'année précédente, etc. <sup>¥</sup> Les teneurs sont exprimées en µg/kg de poids frais.

<sup>£</sup> voir Annexe X.

**Tableau X : Dosages annoncés<sup>s</sup> de l'imidaclopride dans les végétaux autres que le Tournesol**

Rapport	Méthode	Culture	Antécédents Imidaclop.	Type d'échant.	Stade de croissance	n	Imid. (µg/kg)	LD	LQ
M17, M21 et M150 Bonmatin, 2000 M212, Bonmatin, 2002	HPLC-MS/MS	Maïs Gaucho	divers	Tiges et feuilles	divers	12	m= 5,8 min=<0,1 max = 19,8	0,14	1
				Partie mâle		8	m=3,8 min=0,1 max= 9,1		
				Panicules		4	m=10,7 min=3,8 max=19,8		
		Maïs non Gaucho	divers	divers	divers	7	max =7,4 <LD (n=3) <LQ (n=2) >LQ (n=3)		
		Blé non Gaucho	divers	divers	divers	8	<LD (n=3) <LQ (n=3)		
		Colza non Gaucho	divers	divers	divers	21	max = 5,1* <LD (n=5) <LQ (n=12) >LQ (n=1)		
Luzerne non Gaucho	divers	divers	divers	2	<LD				
M209, M214, Bonmatin, 2002	HPLC-MS/MS	Maïs Gaucho	divers	panicules	Divers majoritairement BBCH65	27	m=8,4, max=30,3 1pic interférent <LQ (n=2) >LQ (n=24)	0,25	1
		Maïs non Gaucho	divers	panicules	divers	14	max=18 <LD (n=5) <LQ (n=5) >LQ (n=4)		

<sup>s</sup> Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

**Les études en blanc correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant**

\*Pour les M17, M21, M209 les résultats ne sont pas validés bien que les protocoles le soient, ce qui explique le blanchiment partiel du tableau. Les teneurs moyennes en imidaclopride données dans ces études ont été recalculées en éliminant les échantillons ne correspondant pas aux critères de validations établis par les membres du CST

\* : 3 pics interférents

## b) Validité des résultats

Les critères de validations sont identiques à ceux retenus pour les dosages d'imidaclopride dans les pollens.

### \* Tournesol

De même que pour les dosages de pollens, on note que les études de 1998 pilotées par le laboratoire CNRS/CBM (M30) ne satisfont pas à nos critères de qualité, la technique utilisée n'étant ni assez spécifique, ni assez précise (LQ=10). L'Annexe XI présente néanmoins les analyses individuelles effectuées avec l'historique connu des échantillons.

Pour les études réalisées en 2000 (M17, M21, M150), de même que pour les études de sols, il a été difficile d'obtenir l'historique d'un certain nombre d'échantillons. La comparaison des données brutes des rapports M17 et M21 avec les fiches complètes de prélèvements (2002, M212) révèlent un certain nombre d'ambiguïtés qui ne nous permettent pas de valider ces échantillons (cf Annexe XII). On peut

cependant déjà signaler qu'un certain nombre des échantillons présentés dans le rapport M17 sont des échantillons testés et prélevés en 1998, puis testés à nouveau en 2000 avec une technique optimisée.

Concernant le tournesol, dans le rapport M21, le laboratoire CNRS/CBM s'intéresse à la biodisponibilité de l'imidaclopride dans le tournesol en fonction du stade de croissance, de la variété de la plante et en fonction de la dose d'insecticide utilisée pour l'enrobage de semences. Malheureusement, nous avons relevé certains problèmes dans l'analyse des résultats (Tableau XI) ne nous permettant pas de valider les conclusions de l'auteur de ces rapports.

**Tableau XI: Synthèse des effets étudiés et des problèmes de traitement des données des rapports M17 et M21**

Effet étudié	Nombre d'échantillons	Problème analytique
Etude en fonction du stade de croissance (remontée à la floraison) :	1 échantillon/stade de croissance	Résultats des dosages de 1998 invalidés (LQ=10ppb)
Etude en fonction de la dose (remontée à la floraison)	1 échantillon/stade de croissance	Mélange les données des dosages invalidés de 1998 (LQ=10ppb) et les données des dosages de 2000
Etude en fonction de la variété (remontée à la floraison) :	N=20	Mélange les données des dosages invalidés de 1998 (11 échantillons) (LQ=10ppb) et les données des dosages de 2000
Teneur en imidaclopride lors de la formation des capitules selon les variétés :	N=6	Nombre d'échantillons insuffisants L'auteur commente des analyses de capitules alors que les fiches de prélèvements identifient certains échantillons comme étant des feuilles
Absorption de l'imidaclopride résiduel dans du tournesol non Gaucho l'année du prélèvement avec antécédent Gaucho à n-1	N=59	Ambiguïtés sur 34 échantillons Sur les 25 échantillons restants : aucune donnée concernant les antécédents Gaucho
Absorption de l'imidaclopride résiduel dans du tournesol non Gaucho l'année du prélèvement avec antécédent Gaucho à n-1	N=6	1 dosage invalidé de 1998, 1 échantillon traité Gaucho l'année du prélèvement d'après son code

Si les conclusions des études M17 et M21 nous paraissent caduques et ne sont pas validées, les dosages effectués par Biotec ont néanmoins été effectués selon une méthode validée par le CST. En supprimant les échantillons présentant une mauvaise traçabilité et en corrigeant les problèmes analytiques précédemment cités, nous avons recalculé la teneur en imidaclopride dans le tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement (Tableau XII). Ces teneurs représentent les quantité moyenne d'imidaclopride sur une plante entière, elles doivent être prises seulement à titre indicatif, les calculs ayant été effectués avec des échantillons de nature (tête, capitules, tiges, feuilles) et de stade de croissance différents. Il n'a pas été possible de déterminer les teneurs en imidaclopride résiduel dans le tournesol non traité Gaucho faute d'indication concernant le traitement des années précédentes..

**Tableau XII : Résultats des dosages validés<sup>5</sup> d'imidaclopride dans les Tournesols**

Type d'échantillon	Effectif	Teneur en imidaclopride (ppb) <sup>5</sup>	Répartition
Tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement	31	<p><b>m=4,6</b>            med = 4,02            90<sup>ème</sup> percentile = 7,2            10<sup>ème</sup> percentile = 2,1</p>	<p>Concentrations (ppb)</p>

<sup>5</sup> Les résultats de ce tableau sont calculés en faisant abstraction des échantillons présentant un manque d'informations, des ambiguïtés. Les échantillons validés et utilisés pour ces calculs apparaissent en blanc dans l'Annexe XII

Les études de Bayer (M10 et M11) présentent un très petit nombre d'échantillons ainsi qu'une LQ élevée et ne peuvent donc être validées. Ceci nous donne cependant une indication des teneurs potentiellement observées dans du tournesol traité Gaucho, indications à corrélérer avec les dosages du laboratoire CNRS/CBM.

Les études du CETIOM (M31) indiquent une teneur en imidaclopride dans les feuilles supérieures de tournesol traité plus élevée que celles annoncées dans les études Bayer ou du laboratoire CNRS/CBM. Les études de rémanence sur tournesol entier planté sur un champ avec antécédent Gaucho indiquent sur 28 échantillons au total, une teneur moyenne d'imidaclopride de l'ordre de 10 µg/kg aux stades B4-B10. Cependant, ces dosages concernent des résidus totaux, les études ne sont donc pas validées.

Les études effectuées à l'INRA de Toulouse par Laurent et Scalla (M111) ont été faites dans des conditions de semis confiné. De plus, le semis a été effectué en juillet, ce qui ne reflète pas les conditions normales de croissance du tournesol. Cette étude ne peut donc pas être validée.

#### \* Maïs

Les résultats annoncés dans les études de 2000 du Laboratoire CNRS/CBM (M17, M21, M150) ne peuvent être validés en ce qui concerne le maïs en raison de la prise en compte de certains échantillons qui présentent des ambiguïtés quant à leur traitement, natures etc... Néanmoins, la méthode de dosage correspond aux critères de validation du CST, les échantillons présentant une bonne traçabilité peuvent donc être pris en compte (cf. Annexe XII).

Le rapport M209 du même laboratoire prend en compte 2 types d'échantillons : 15 échantillons prélevés en 1998, précédemment analysés et à l'historique incertain, 26 échantillons de panicules prélevés en 2000 par la société Testapi présentant une bonne traçabilité (16 traités Gaucho l'année du prélèvement, 10 non traités) (cf Annexe XIII). Les quinze échantillons de 1998 ont à nouveau été analysés, une grande variabilité dans les teneurs en imidaclopride a été relevée selon l'année du dosage. Compte tenu de ces différences et des ambiguïtés portant sur certains échantillons, il est suggéré de ne prendre en compte, pour le dosage de l'imidaclopride dans les panicules de maïs de

<sup>5</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3 ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride < LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2, pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations

2000, que les résultats des dosages des 26 nouveaux échantillons prélevés par Testapi. Les teneurs calculées sont indiquées dans le Tableau XIII.

**Tableau XIII : Résultats des dosages validés<sup>§</sup> d'imidaclopride dans différentes parties végétales de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement.**

Type d'échantillon	Effectif	Teneur en imidaclopride <sup>6</sup>	Répartition
Panicules de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement (échantillons, 2000, Testapi, M209)	16	$m=7,5$ médiane = 5,8 90 <sup>ème</sup> percentile = 16,5 10 <sup>ème</sup> percentile = 1,6	
Panicules de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement (échantillons de 1998, M21)	7	$3 < m < 3,1$ médiane = 2,6 90 <sup>ème</sup> percentile = 6 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5	
Feuilles et/ou tiges de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement (échantillons de 1998, M21)	10	$3,6 < m < 3,8$ médiane = 3,1 90 <sup>ème</sup> percentile = 7,5 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5	

<sup>§</sup> Les résultats de ce tableau sont calculés en faisant abstraction des échantillons présentant un manque d'informations, des ambiguïtés. Les échantillons validés et utilisés pour ces calculs apparaissent en blanc dans les Annexes XII et XIII.

Seul un échantillon non traité Gaucho l'année du prélèvement par Testapi a été prélevé sur sol ayant reçu une culture maïs traitée Gaucho l'année précédente. Il est donc là encore impossible de conclure quant à une « remontée » possible de l'imidaclopride dans les fleurs de maïs.

\* **Plantes autre que tournesol et maïs**

Des échantillons de Colza non traité Gaucho l'année du prélèvement mais cultivés sur sol ayant reçu des semences enrobées (Blé, orge) l'année précédente figurent également dans les rapports M17 et M21 et M150. Nous n'avons pas relevé d'ambiguïtés dans leur historique lors de la comparaison avec

<sup>6</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3 ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride < LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2, pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations

les fiches de prélèvements. Les teneurs moyennes en imidaclopride calculées apparaissent dans le Tableau XIV, 95% présentent des teneurs en imidaclopride inférieures à la limite de quantification.

**Tableau XIV : Résultats des dosages validés d'imidaclopride dans des échantillons de Colza non traité Gaucho l'année du prélèvement mais avec antécédent l'année précédente**

Type d'échantillon	Effectif	Teneur en imidaclopride <sup>7</sup> (ppb)	Répartition
Parties végétales de Colza non traité Gaucho l'année du prélèvement mais cultivé sur sol à antécédent Gaucho.	17	<b>0,39 &lt; m &lt; 0,98</b> mediane = 0,5 90 <sup>ème</sup> percentile = 0,5 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,07	

Les échantillons validés et utilisés pour ces calculs apparaissent en blanc dans l'Annexe XII

Les études visant à déterminer l'absorption d'imidaclopride résiduel sur le blé et la luzerne n'ont pu être validées en raison du faible nombre d'échantillon.

### c) Commentaires et perspectives

Les nombreux dosages effectués ne nous donnent malheureusement que des résultats partiels et peu comparables entre eux. Seules les études pilotées par le Laboratoire CNRS/CBM, une fois les incertitudes levées sur les types d'échantillons, permettent d'avoir une vue globale sur les doses en imidaclopride présentes dans les parties supérieures de la plante au cours de la croissance. Pour les parties végétales du tournesol, les échantillons validés nous permettent d'indiquer (avec les réserves précédemment émises) des teneurs globales en imidaclopride d'environ **4,2 ppb pour les capitules de tournesol traité l'année du prélèvement** et de **6,5 ppb dans les feuilles**.

Ces résultats sont à souligner en regard de la possibilité de consommation de nectar extrafloral par les abeilles particulièrement sur tournesol. Ce nectar, sécrété par les jeunes plants de tournesol au niveau de la partie inférieure des feuilles pourrait contenir des quantités importantes d'imidaclopride compte tenu de la précocité de sa sécrétion.

On notera également qu'un dosage des métabolites de l'imidaclopride a été effectué dans des échantillons de tournesol. La méthode n'étant pas assez spécifique (LQ= 10), nous ne disposons d'aucune donnée d'exposition valides des métabolites dans les végétaux.

On observe une concentration de l'imidaclopride dans les **panicules de maïs avec une teneur moyenne de 7,5 ppb**. Les autres parties végétales (tiges, feuilles, partie mâle) contiennent également des quantités non négligeables d'imidaclopride (autour de 3 ppb).

De même, nous ne disposons d'aucune donnée concernant la possibilité d'absorption d'imidaclopride résiduel par espèce (hormis le colza) non traitée Gaucho l'année du prélèvement.

*Les experts du CST préconisent donc :*

- la mise au point d'une technique de dosage des produits de dégradation en regard des données de toxicité chronique et des effets subletaux,
- la poursuite des dosages dans les parties végétales visitées par les abeilles (pollen, nectar) de tournesol et maïs traités Gaucho contenant du nectar extrafloral

<sup>7</sup> La moyenne (**m**) est encadrée par une valeur minimale et une valeur maximale, chacune calculée à partir des valeurs de limites de quantification et de détection. Par exemple, si LD = 0,3ppb et LQ = 1 ppb, on choisit d'encadrer un échantillon A ayant une teneur en imidaclopride < LD par les valeurs 0 et 0,3 ppb. Un échantillon B ayant une teneur en imidaclopride < LQ aura une valeur comprise entre 0,3 et 1 ppb. Pour l'échantillon A, la médiane est calculée en prenant la valeur LD/ 2 , pour l'échantillon B, la valeur LQ/2. Ces conventions sont utilisées lors de toutes nos estimations

- la poursuite des dosages dans les différentes parties végétales de tournesol et maïs non traités Gaucho l'année du prélèvement mais cultivés sur sol à antécédent les années précédentes.  
Les prélèvements se feront selon les BPL.

### 3.4 Evaluation des quantités de pollen et de nectar éventuellement contaminées et ramenées à la ruche

La quantité d'imidaclopride susceptible d'entrer dans une colonie est très variable et dépend des types et de la surface des cultures traitées présentes dans son environnement, ainsi que des choix de butinage des ouvrières quant au pollen et / ou au nectar récoltés.

Le rayon de butinage des ouvrières peut varier de plusieurs centaines de mètres à quelques kilomètres, en fonction des besoins de la colonie et des ressources présentes dans l'environnement. A titre d'exemple, pour un rayon d'action de 200 m, la surface visitée est de 0,13 km<sup>2</sup>, pour 1 km, elle est de 3,14 km<sup>2</sup> ; pour 5 km, elle est de 78,5 km<sup>2</sup>. Sur 6200 observations, Von Frisch (1967, A173) a montré que 20% des abeilles butinaient à des distances supérieures à 2 km. Récemment, une étude a montré que les abeilles peuvent parcourir des distances de vol supérieures, comprises entre 6 km et 7,5 km (Beekman et Ratnieks 2000, A144).

De manière évidente, s'il y a peu de cultures traitées dans l'aire de butinage, les risques sont moindres que si elles sont nombreuses. Rappeler ceci est néanmoins important puisque le fait qu'il soit très difficile, voire impossible, de contrôler en plein champ l'activité de butinage, pourrait expliquer les nombreuses différences constatées dans les mortalités d'abeilles chez les apiculteurs comme chez les expérimentateurs lors des expériences en plein champ.

L'imidaclopride éventuellement présent dans le pollen et le nectar (puis le miel) pourrait entraîner des effets toxiques qui se manifesteraient sur certaines catégories d'ouvrières (nourrices, butineuses,...), à plus ou moins long terme.

Lorsque les quantités d'insecticide ramenées par les abeilles sont *importantes et consommées rapidement* après la récolte, les mortalités d'abeilles pourraient être nombreuses et entraîner une diminution de population. Ces mortalités pourraient avoir des répercussions sensibles sur l'activité de butinage de la colonie et sur la quantité de nourriture récoltée.

Lorsque les quantités d'insecticide ramenées par les abeilles sont *importantes et consommées tardivement* après la récolte, elles pourraient entraîner des effets retardés sur la colonie, par exemple, en automne ou en hiver, lorsque les abeilles consomment le miel de réserve ou en fin d'hiver lorsqu'elles consomment le pollen pour l'élevage du nouveau couvain.

#### 3.4.1 Cas du pollen

##### a) Apports annuels de pollen dans la colonie

La quantité de pollen qui est récoltée annuellement par les abeilles est de l'ordre de plusieurs dizaines de kilos, pouvant aller jusqu'à 55 kg (Louveau, 1968, A83; Seeley, 1985, A84 ; Winston, 1987, A85). Il s'agit d'un mélange issu de nombreux types de plantes. Parmi les pollens de plantes récoltés par les abeilles et susceptibles d'être contaminés par l'imidaclopride, le pollen de tournesol et le pollen de maïs sont en abondance (Louveau, 1985, A91 ; Pham-Délégué et Ramirez-Romero, 2002 ; M106 Odoux *et al.* 2003, A159). La quantité de pollen de maïs et de tournesol qui rentre à la ruche dépend évidemment de la surface totale de ces 2 types de cultures plantées autour de la colonie.

Pour quantifier les apports de pollen, on utilise des trappes à pollen. Les trappes sont placées à l'entrée de la ruche et comportent une grille munie de trous que les abeilles traversent en faisant tomber une partie du pollen qu'elles transportent. La quantité de pollen récolté dans les trappes varie en fonction du type de trappe utilisé. Autrefois, les trappes utilisées avaient un rendement de l'ordre de 10 % (Louveau, 1968, A83). Actuellement, il semble que le rendement de certaines trappes soit compris entre 20 % et 40 % (Fert et Marty, communication personnelle). En connaissant la quantité de pollen récupéré dans les trappes, on peut donc évaluer, très grossièrement, la quantité de pollen ramené à la ruche.

Le pollen de trappes est un échantillon de ce que les abeilles prélèvent dans leur environnement (dans un rayon de quelques centaines de mètres à plusieurs kilomètres) et rapportent à la ruche. Si la ruche est située dans une zone qui comporte des cultures traitées (par différents pesticides) et non traitées, les pelotes récupérées par les expérimentateurs sont donc un **mélange** de pollens de ces diverses sources.

Des études récentes ont analysé la récolte quotidienne de pollen de maïs et de tournesol pendant la floraison de ces plantes.

-1/ La première étude a porté sur 24 colonies (ACTA, 1998, M32, M166 et M170 ; ACTA, 1999, M232) mais nous n'avons obtenu les résultats détaillés que pour 18 d'entre elles (Vendée Marais, Vendée Plaine et Indre). La quantité totale de pollen récoltée dans les trappes, pendant toute la floraison de ces plantes, variait en moyenne entre 0,86 kg et 4 kg/colonie. La méthode d'analyse pollinique semi quantitative utilisée par le CNEVA ne permettant pas d'atteindre la précision d'une analyse quantitative, les quantités respectives des différents types de pollen ne sont pas connues. Toutefois, le pollen principal retrouvé était généralement du tournesol.

-2/ La seconde étude a porté sur 20 colonies (Syndicat d'Apiculture du Lot et Garonne, 1998, T2). Les quantités de pollen récoltées dans les trappes variaient entre 0,1 kg et 3 kg/colonie pour le tournesol et 0,02 kg et 3,8 kg pour le maïs pour toute la période de floraison de ces deux plantes. La méthode d'analyse pollinique utilisée n'est pas précisée.

-3/ La troisième étude a analysé les pollens récoltés dans les trappes par 10 colonies, 2 en 2001 et 8 en 2002 (Odoux *et al.* 2003, A159), placées en milieu de grandes cultures (maïs, colza et tournesol). Cette étude a mis en évidence deux points intéressants :

- la récolte de pollen de tournesol s'étale de fin juin à mi-septembre, la récolte de maïs de mi-juillet à début septembre
- lorsque la quantité de pollen est évaluée (par analyse pollinique sur lame) par le nombre de grains, elle sous-estime généralement le poids du pollen de tournesol et de maïs récolté, car ces deux types de pollen ont des tailles nettement supérieures aux autres types. La méthode utilisée par ces auteurs permet, cette fois-ci, de tenir compte de la masse réelle du pollen récolté. Ainsi, les auteurs ont trouvé dans les trappes de colonies d'abeilles placées en zone de grandes cultures, 90% de pollen de tournesol et 80% de pollen de maïs, au moment de la floraison respective de ces deux cultures.

#### \* **Pollen de tournesol**

Les plants de tournesol produisent du pollen pendant une quinzaine de jours (Pham-Delègue et Bonjean, 1983, A87). Comme il y a un décalage dans les floraisons entre plusieurs parcelles ou plusieurs variétés de tournesol, la période de récolte de pollen pour une colonie peut s'étaler pendant 2 mois et demi environ (Odoux *et al.* 2003, A159).

En fonction du rendement de la trappe, on peut calculer la quantité de pollen de tournesol récoltée par les abeilles.

-1/ Les résultats de l'ACTA (1998, M32, M166 et M170 ; ACTA, 1999, M232) ne peuvent pas être exploités car on ne connaît pas la proportion de pollen de tournesol récoltée dans les trappes.

-2/ Selon les résultats du Syndicat d'Apiculture du Lot et Garonne (1998, T2), si la trappe a un rendement de 20 %, la quantité varie entre 0,5 kg et 15 kg / colonie; si le rendement est de 40 %, la quantité varie entre 0,25 kg et 7,5 kg / colonie.

-3/ Selon les résultats d'Odoux *et al.* (2003, A144), le pollen récolté dans les trappes lors de la floraison du tournesol est en volume à 90 % du tournesol.

#### \* **Pollen de maïs**

La production de pollen de maïs est très importante et celui-ci est récolté abondamment par les abeilles (Louveau, 1985, A91, Pham-Délègue et Ramirez-Romero, 2002, M106).

-1/ En France, les données obtenues par la Société Michaud (plus gros négociant de miel français) montrent que chaque année, entre 30 et 40 % des ruchers français sont au contact de pollen de maïs (GDSA, 2001, T1).

-2/ Dans l'étude sus citée (Syndicat d'Apiculture du Lot et Garonne, 1998, T2), les proportions de pollen de tournesol et de maïs dans le mélange sont respectivement de 38% et 62%. Les auteurs ont également noté que "dès que les maïs sont en fleurs, les abeilles délaissent le pollen de tournesol pour aller butiner celui du maïs". En fonction du rendement de la trappe, on peut calculer la quantité de pollen de maïs stocké dans la ruche par les abeilles. Si le rendement de la trappe est de 20 %, la quantité varie entre 0,1 kg et 19 kg / colonie ; si il est de 40 %, la quantité varie entre 0,05 kg et 9,5 kg / colonie.

-3/ Selon les résultats d'Odoux *et al.* (2003, A144), le pollen récolté dans les trappes, au moment de la floraison du maïs, est en volume, à 80% du maïs.

#### b) Estimation des quantités théoriques d'imidaclopride ramenées à la ruche

Nous soulignons le fait que l'évolution de l'imidaclopride dans le pollen, le nectar puis le miel stocké à la ruche est jusqu'à alors inconnue.

#### \* Pollen de tournesol

Compte tenu des données validées concernant les dosages d'imidaclopride dans le pollen de tournesol traité Gaucho (entre 3,3 à 3,4 ppb, soit en moyenne 3,35 ppb pour le pollen de fleur et entre 2,1 à 2,3 ppb, soit en moyenne 2,2 ppb pour le pollen de trappe ; voir paragraphe 2.1.1) et sachant que les colonies ramènent entre 0,25 et 15 kg de pollen de tournesol par an, nous pouvons estimer les quantités théoriques d'imidaclopride ramenées à la ruche (voir Tableau XLI).

Il est important de souligner que les résultats de dosage de l'imidaclopride dans le pollen de trappe se basent sur une quantité de pollens mélangés, qui peut éventuellement conduire à une sous estimation du contenu en imidaclopride du pollen de tournesol traité Gaucho. Par ailleurs, la présence de trappe à pollen entraîne des perturbations au niveau de l'activité de la colonie, le pollen de trappe peut ne pas être représentatif quantitativement des quantités entrantes d'imidaclopride.

**Tableau XV : Quantités théoriques totales d'imidaclopride contenues dans le pollen de la ruche à partir du pollen de tournesol (rendement 20%)**

Quantités théoriques totales d'imidaclopride contenues dans le pollen ramené à la ruche (µg)		Concentrations d'imidaclopride contenues dans le pollen (µg/kg ou ppb)	
		Pollen de fleurs	Pollen de trappes
		3,35	2,2
Quantités de pollen ramenées à la ruche (kg)	0,25	0,84	0,55
	5	16,7	11
	10	33,5	22
	15	50,2	33

Ultérieurement, quand la stabilité chimique de l'imidaclopride dans le pollen stocké sera évaluée, le modèle de quantification de l'imidaclopride dans le pollen présenté ci-dessus pourra, si besoin, être révisé.

#### \* Pollen de maïs

Compte tenu des données validées concernant les dosages d'imidaclopride dans le pollen de maïs traité Gaucho (entre 3,28 à 3,65 ppb, soit en moyenne 3,47 ppb pour le pollen de fleur et entre 0,69 et 0,81 ppb, soit en moyenne 0,75 ppb pour le pollen de trappe ; voir paragraphe 2.1.1), et sachant que

les colonies ramènent entre 0,05 et 19 kg de pollen de maïs par an, nous pouvons estimer les quantités théoriques d'imidaclopride ramenées à la ruche (voir Tableau XVI)

Il est important de souligner que les résultats de dosage de l'imidaclopride dans le pollen de trappe se basent sur une quantité de pollens mélangés, qui peut donc conduire à une sous estimation du contenu en imidaclopride du pollen de tournesol traité Gaucho.

**Tableau XVI : Quantités théoriques d'imidaclopride contenues dans le pollen de la ruche à partir du pollen de maïs**

Quantités théoriques totales d'imidaclopride contenues dans le pollen ramené à la ruche (µg)		Concentrations d'imidaclopride contenues dans le pollen (µg/kg ou ppb)	
		Pollen de fleurs	Pollen de trappes
		3,47	0,75
Quantités de pollen ramenées à la ruche (kg)	0,05	0,17	0,04
	0,1	0,35	0,075
	1	3,47	0,75
	10	34,7	7,5
	19	66	14,25

### 3.4.2 Cas du nectar et du miel de tournesol

La quantité de nectar de tournesol ramenée à la ruche est difficile à estimer car elle dépend de multiples facteurs (variétés, climat, pédologie, etc.) qui sont eux-mêmes variables.

Ce nectar a deux devenirs : d'une part, il sera consommé comme tel par les abeilles, et d'autre part il sera transformé en miel par action enzymatique et par évaporation d'environ 60 % d'eau (Maurizio, 1976, A92). Le miel présent dans le corps de la ruche sera laissé par l'apiculteur aux abeilles pour leur propre consommation. Par contre, le miel stocké dans les hausses sera récolté par l'apiculteur.

Nous ne connaissons pas les quantités de nectar ramenées à la ruche par les abeilles. Pour une ruche donnée, la seule valeur dont nous disposons est la quantité de miel récoltée par l'apiculteur. Pour le miel de tournesol, celle-ci se situe généralement entre 20 et 80 kg / an ; cette dernière valeur ne semblant plus atteinte depuis quelques années. De ce fait, les évaluations se feront avec une valeur maximale de 40kg de miel de tournesol

La proportion de nectar non transformée est difficile à déterminer avec précision. Elle a été estimée grossièrement à 60 % par Seeley (1995, A82). Par exemple, pour une récolte de 120 kg de nectar, 70 kg seraient consommés en tant que tel par les abeilles et 50 kg seraient transformés en 20 kg de miel. Toutefois ces données ne reposent que sur une seule référence bibliographique qui ne porte d'ailleurs pas sur le miel de tournesol ; il ne s'agit donc là que d'une indication qui devra être précisée par la suite. Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer la proportion de nectar consommé comme tel et non transformé en miel.

#### \* Cas du nectar

Pour le calcul de la quantité d'imidaclopride contenue dans le nectar consommé en tant que tel par les abeilles, nous choisirons arbitrairement, à titre d'exemple (Tableau XVII) le cas de 2 colonies à partir desquelles l'apiculteur aura récolté: 20 kg (colonie A) et 40 kg (colonie B), de miel. La quantité de nectar consommée par les abeilles est calculée selon les estimations de Seeley (1995, A82) (avec les réserves que nous avons soulignées), à partir de la quantité de miel produite.

Une seule étude de dosage de l'imidaclopride dans le nectar de tournesol étant validée (voir paragraphe 2.1.2), nous estimerons les quantités théoriques d'imidaclopride contenues dans le nectar de tournesol stocké dans la ruche en fonction de cette teneur de 1,9 ppb (Tableau XVII). Quand la

stabilité chimique de l'imidaclopride dans le nectar stocké à la ruche sera évaluée, le modèle de quantification de l'imidaclopride dans le nectar présenté ci-dessous pourra, si besoin, être révisé.

**Tableau XVII : Quantités théoriques d'imidaclopride contenues dans le nectar de tournesol stocké dans la ruche**

Quantités théoriques d'imidaclopride contenues dans le nectar de tournesol (en µg) consommé (pour les colonies A et B)			Concentrations d'imidaclopride contenues dans le nectar de tournesol (µg/kg ou ppb)
			1,9
Quantités de nectar non transformées (kg)	A	70	133
	B	140	266

\* **Cas du miel**

Pour le calcul de la quantité d'imidaclopride contenue dans le miel de réserve consommé par les abeilles, nous nous intéresserons seulement au miel laissé par l'apiculteur dans le corps de la ruche (et pas à celui qu'il récolte dans les hausses).

Un corps de ruche standard contient 10 cadres. Chaque cadre est rempli en moyenne de 1,5 à 3 kg de miel, ce qui fait entre 15 et 30 kg de miel pour la consommation des abeilles (Jean-Prost, 1979, A93). Ce miel peut provenir de plusieurs types floraux, et en particulier peut comporter du tournesol en quantités variables.

A titre indicatif, et comme hypothèse de travail, nous pouvons utiliser l'ensemble de ces données pour proposer un modèle de contamination du miel de réserve dans une ruche. Dans l'exemple qui va suivre, nous ne considérerons que le cas extrême d'un miel de réserve uniquement composé de tournesol. Il va sans dire que dans les conditions naturelles, ce cas est probablement peu fréquent (sauf, peut-être, dans des régions particulières) et que le miel de réserve est constitué d'un mélange de miels de différentes origines florales, qui ne sont pas tous contaminés par l'imidaclopride.

Sachant que lors de la transformation de nectar en miel il y a 60% de perte en poids, 15 à 30 kg de miel proviennent donc de 37,5 à 75 kg de nectar. Pour une concentration de 1,9 ppb d'imidaclopride dans le nectar, la quantité théorique d'imidaclopride contenue dans le miel du corps de ruche est donc de 71,25 à 142,5 µg. Ultérieurement, quand les stabilités chimiques de l'imidaclopride dans le miel seront évaluées, le modèle de quantification de l'imidaclopride dans le miel pourra, si besoin, être révisé.

### 3.5 Récapitulatif concernant les Données d'expositions sur tournesol et maïs.

#### 3.5.1 Critères de validations :

Les critères de validation des résultats de dosages de pollen retenus par les membres du CST sont :

- N°1 : un nombre d'échantillons suffisant provenant de sites distincts. Dans certains cas (dosage de nectar) plusieurs expérimentations peuvent être regroupées à condition que les méthodes de prélèvements et dosages soient homogènes.
- N°2 : un historique complet et sans ambiguïtés des échantillons et des méthodes d'échantillonnages selon le substrat étudié
- N°3 : des limites de quantification et de détection annoncées dans les études et suffisamment basses (LQ=1 ppb ; LD<0,5 ppb), pour les études des substances ingérées par l'abeille.
- N°4 : une méthode de dosage spécifique de l'imidaclopride et de ses métabolites afin de limiter les incertitudes lors de l'évaluation de risques (pas de dosages de résidus totaux)
- N°5 : un poids d'échantillon conforme au poids requis par la validation de la méthode

#### 3.5.2 Dosages de l'imidaclopride dans les pollens de tournesol et de maïs :

Nombre d'études 12

Etudes invalidées : 8

Plantes	Références	Motifs d'invalidations (non respect du critère N°)
T (+M)	M29, Bonmatin, 1998	2, 3
T	M10, Schmuck et al, 1999	1, 3
T	M11, Schmuck et al, 1999	1, 3
T	M31, Lagarde, 2000	4
T	M111, Laurent et Scalla, 2001	1, 3, 6
M	M34, Bonmatin, 2001	1, 2
M	M147, Schmuck et al, 1999	2, 3
M	M148, Schmuck et al, 1999	2, 3

T = tournesol, M=maïs

Etudes et résultats validées : 4

Plantes	Références	Teneurs moyennes validées (ppb)
Tt	M34, Bonmatin, 2001	<b>2,1&lt;m&lt;2,3</b> médiane = 1,6 90 <sup>ème</sup> percentile = 3,9 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5
Tf	M5, Stork, 1999	<b>3,3&lt;m&lt;3,4</b>
Mt	M210, Bonmatin, 2002	<b>0,69&lt;m&lt;0,81</b> médiane = 0,215 90 <sup>ème</sup> percentile = 1,36 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,215
Mf	M210, Bonmatin, 2002	<b>3,28&lt;m&lt;3,65</b> médiane = 1,2 90 <sup>ème</sup> percentile = 8,55 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5

Tt = pollen de trappe sur zone tournesol traitée Gaucho, Tf = pollen de fleurs de tournesol traitée Gaucho, Mt = pollen de trappe sur zone maïs traitée Gaucho, Mf = pollen de panicules de maïs traité Gaucho.

**3.5.3 Dosages de l'imidaclopride dans le nectar de tournesol****Nombre d'études : 6****Etudes invalidées : 5**

Plantes	Références	Motifs d'invalidations (non respect du critère N°)
T	M28, Bonmatin, 1998	2, 3
T	M37, Bonmatin, 2001	1
T	M10, Schmuck et al, 1999	1, 3
T	M11, Schmuck et al, 1999	4
T	M31, Lagarde, 2000	1, 4

T = tournesol

**Etudes et résultats validés : 1**

Plantes	Références	Teneurs moyennes validées (ppb)
Tf	M5, Stork, 1999	<b>m = 1,9</b>

Tf = nectar de fleurs de tournesol

**3.5.4 Dosages de l'imidaclopride dans les sols et rémanence****Nombre d'études : 4****Etudes invalidées : 2**

Plantes cultivées	Références	Motifs d'invalidations (non respect du critère N°)
T	M10, Schmuck et al, 1999	1, 3
T	M11, Schmuck et al, 1999	1, 3

**Etudes et résultats validés : 2**

Plantes	Références	Teneurs moyennes validées (ppb)
Tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement	M21 et documents associés (M19, M150) Bonmatin, 2000-2001	<b>10,2 &lt; m &lt; 10,3</b> médiane = 7,45 90 <sup>ème</sup> percentile = 20,18 10 <sup>ème</sup> percentile = 1,5
Tournesol non traité Gaucho l'année du prélèvement mais avec antécédent Gaucho à A-1	M21 et documents associés (M19, M150) Bonmatin, 2000-2001	<b>4,29 &lt; m &lt; 4,48</b> médiane = 2,35 90 <sup>ème</sup> percentile = 12,75 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,5

### 3.5.5 Dosages de l'imidaclopride dans les parties végétales de tournesol et maïs non visitées par les abeilles

**Nombre d'études : 8**

**Etudes invalidées : 6**

Plantes	Références	Motifs d'invalidations (non respect du critère N°)
T	M30, Bonmatin, 1998	3
T	M10, Schmuck et al, 1999	1, 3
T	M11, Schmuck et al, 1999	1, 3
T	M31, Lagarde, 2000	4
T	M111, Laurent et Scalla, 2001,	6
T	M111, Laurent et Scalla, 2001	6

**Etudes et résultats validés : 2**

Plantes	Références	Teneurs moyennes validées (ppb)
Tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement	M21 et documents associés (M17, M150), Bonmatin, 2002	<b>m=4,6</b> médiane = 4 90 <sup>ème</sup> percentile = 7,2 10 <sup>ème</sup> percentile = 2,1
Tournesol non traité Gaucho l'année du prélèvement mais avec antécédent à A-1	M21 et documents associés (M17, M150), Bonmatin, 2002	<b>Feuilles : 0,8&lt;m&lt;1,1 ;</b> médiane = 0,07 ; 90 <sup>ème</sup> percentile = 2,1 ; 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,07 <b>Tiges : 4,5&lt;m&lt;4,7 ;</b> médiane = 0,5 ; 90 <sup>ème</sup> percentile = 11,8 ; 10 <sup>ème</sup> percentile = 0,07
Feuilles et tiges de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement	M21 et documents associés (M17, M150), Bonmatin, 2002	<b>3,6&lt;m&lt;3,8,</b> médiane=3,1 ; 90ème percentile = 7,5 10ème percentile = 0,5
Partie mâle de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement	M21 et documents associés (M17, M150), Bonmatin, 2002	<b>3&lt;m&lt;3,1,</b> mediane=2,6 ; 90ème percentile = 6 10ème percentile = 0,5
Panicules de Maïs traité Gaucho l'année du prélèvement	M209, Bonmatin, 2002	<b>m=7,5</b> médiane = 5,8 90 <sup>ème</sup> percentile = 16,5 10 <sup>ème</sup> percentile = 1,6

## 4 DONNEES DE TOXICITE

Le travail d'évaluation des études portant sur le dosage et la toxicité des insecticides systémiques a nécessité une analyse très approfondie des rapports et des publications reçus par le CST.

### 4.1 Effets létaux de l'imidaclopride et de ses dérivés sur les abeilles

#### 4.1.1 Mortalité suite à une intoxication par une seule administration de substance active

##### a) Résultats disponibles

##### \* Imidaclopride

Des études de toxicité orale aiguë ont été effectuées :

- par la société Bayer (1990, M134, 1995, M7 et M8 et 1999, M6),
- par différents laboratoires pour le compte de la société Bayer (2000 M217, M219, M220),
- par l'Inra d'Avignon (Suchail, 2001, M47)
- par l'Inra de Bures-sur-Yvette (Decourtye en septembre 2000, M191).

Les résultats complets sont présentés dans le Tableau XVIII.

Des études de toxicité aiguë par contact ont été également effectuées :

- par la société Bayer (1990, M134, 1995, M7; ),
- par des laboratoires pour la société Bayer (2000, M217, M218, M220)
- et par l'INRA d'Avignon (Suchail, 2001, M47).

Les résultats complets sont présentés dans le Tableau XIX

**Tableau XVIII : Etudes de la toxicité de l'imidaclopride vis-à-vis des abeilles : mortalité suite à une intoxication aiguë (1 seule administration) par voie orale**

Rapport*	Abeille	Age	Période de test	Nbre abeilles	Conditions	Produit testé Teneur en ma	DL <sub>50</sub> 48h ng ma/ab
M134 Cole, 1990 (Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	inconnu	août	2x10 abeilles par dose 5 doses	25±1°C obscurité	Imidacl. 99,8%	<b>3,7</b>
M7 Schmitzer, 1995 (Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	4-6 semaines	24-27 juillet	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	27-29°C 45-80% humidité obscurité	Confidor SC200 205,9g/l	<b>21,2</b>
M8 Schmitzer, 1995 (Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	4-6 semaines	24 juillet - 18 août	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	27-29°C 45-80% humidité obscurité	Confidor WG70 69,3%	<b>11,7</b>
M6 Schmitzer, 1999 (Bayer)	<i>Apis mellifera carnica</i>	4-6 semaines	6-10 juillet	3 x 10 abeilles par dose 8 doses	29°C 50-70% humidité obscurité	Imidacl. 99,4%	<b>40,9</b>
Cité dans A26 Schmuck <i>et al.</i> , 2001 (Bayer)	<i>Apis mellifera</i>						<b>&gt;21,0</b>
M47 Suchail, 2001 (INRA Avignon)	<i>Apis mellifera mellifera caucasica</i>	Supposé >20j		3 x 20 abeilles par dose 3 répétitions	25°C 50-70% humidité obscurité	Imidacl 98%	<b>4,8</b> [4,5-5,1] 57 [54,2-59,8]* <b>6,5</b> [4,7-8,3]
M257, Decourtye, 2002	<i>Apis mellifera ligustica</i>	ouvrières adultes		20 abeilles par cagette 5 doses			<b>30,6</b>
M217 Wilhelmy, 2000 (pour Bayer)	<i>Apis mellifera carniac</i>	Jeunes ouvrières	5-8 mai	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	25-26°C 60-84% humidité obscurité	Imidacl.	<b>&gt;34,70</b>
M219 Thompson, 2000 (pour Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	2 jours à 3 semaines	8-11 mai	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	25-26°C 60-70% humidité obscurité	Imidacl.	<b>&gt;45</b>
M220 Barth, 2000 (pour Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	Ouvrière s adultes	31 juin-2 juillet	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	24-26°C 63-75% humidité obscurité	Imidacl.	<b>&gt;70,3</b>

\* valeurs obtenues lors d'une deuxième expérience (cf Tableau XX),

Les études **en blanc** correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant.

**Tableau XIX : Etudes de la toxicité de l'imidaclopride vis-à-vis des abeilles : mortalité suite à intoxication aiguë (1 seule administration) par voie topique**

Rapport*	Abeille	Age	Période de test	Nbre abeilles	Produit testé Teneur en ma	Cosolvant utilisé	Quantité déposée /ab	DL <sub>50</sub> 48h ng ma/ab
M134 Cole, 1990	<i>Apis mellifera</i>	inconnu	Août	2x10 abeilles par dose 5 doses	imidaclopride 99,8%	DMF	1µL	<b>81</b>
M7 Schmitzer 1995	<i>Apis mellifera</i>	4-6 semaines	24-27 juillet	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Confidor SC200 205,9g/l	Acétone/Eau (1:1 v/v)	5µL	<b>60</b>
M8 Schmitzer 1995	<i>Apis mellifera</i>	4-6 semaines	24 juillet - 18 août	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Confidor WG70 69,3%	Acétone/Eau (1:1 v/v)	5µL	<b>242,6</b>
Cité dans A26 Schmuck <i>et al.</i> , 2001 (Bayer)	<i>Apis mellifera</i>							<b>230,3</b>
M47 Suchail, 2001	<i>Apis mellifera mellifera</i> <i>Apis mellifera caucasica</i>	Supposé >20j		3 x 20 abeilles par dose 3 répétitions	Imidaclopride 98%	DMSO	1µL	<b>6,7</b> [4,4-9] <b>24,3</b> [22-26,6] (courbe biphasique) <b>12,8</b> [9,7-15,9]
M217 Wilhelmy, 2000 (pour Bayer)	<i>Apis mellifera carnica</i>	Jeunes ouvrières	5-8 mai	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Imidaclopride 98%	acétone	5µl/abeille	<b>42,9</b>
M218 Thompson, 2000 (pour Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	2 jours à 3 semaines	8-11 mai	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Imidaclopride 98%	acétone	1µl/abeille	<b>50</b>
M220 Barth, 2000 (pour Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	Ouvrières adultes	31 juin-2 juillet	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Imidaclopride 98%	acétone	1µl/abeille	<b>74,9</b>

Les études **en blanc** correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant.

\* **Métabolites de l'imidaclopride**

Après un traitement par graines enrobées, l'imidaclopride est métabolisé, plus ou moins complètement selon les espèces de plantes, en de nombreux métabolites qui ont tous en commun le cycle 2-chloropyridine.

La toxicité de chaque métabolite est évaluée en déterminant leur valeur de DL<sub>50</sub>. La DL<sub>50</sub> de l'imidaclopride sert de référence pour comparer les DL<sub>50</sub> des métabolites.

Les études ont été effectuées :

- par la société Bayer (Schmitzer, 1999, M135 et M136),
- par l'INRA d'Avignon (Suchail, 2001, M47)
- par l'INRA de Bures-sur-Yvette (Decourtye, 2002, M257).

L'ensemble des résultats est présenté dans le Tableau XX.

**Tableau XX : Etudes de la toxicité des métabolites de l'imidaclopride vis-à-vis des abeilles : mortalité suite à une intoxication aiguë par voie orale par les dérivés 5-hydroxylé et oléfine**

Rapport*	Abeille	Age	Période de test	Nbre abeilles	Conditions	DL <sub>50</sub> 48h ng/ab 5-hydroxy	DL <sub>50</sub> 48h ng/ab oléfine	Rappel DL <sub>50</sub> imidaclopride ng/ab
M135, M136 Schmitzer, 1999 (Bayer)	<i>Apis mellifera</i>	inconnu	septembre 1999	3 x 10 abeilles par dose 7 doses	27-28°C 41-58% humidité	159,2	> 35,7	40,9
M47 Suchail, 2001 (INRA Avignon)	<i>Apis mellifera mellifera</i>	supposé >20jours		3 x 20 abeilles par dose 3 répétitions	25°C 50-70% humidité obscurité	258±70	28±19	57 ± 28
M257 Decourtye et al, 2002 (INRA Bures-sur-Yvette)	<i>Apis mellifera ligustica</i>	ouvrières adultes		20 ab/ cagette 5 doses		153,4±0,1	30,1±0,1	30,6

Les études **en blanc** correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant.

#### b) Validité des résultats

Les tests de mortalité engendrée par une intoxication aiguë (1 seule administration) respectent les directives OCDE n°213<sup>8</sup> (toxicité suite à une administration par voie orale) et n°214 (toxicité suite à une administration par contact)<sup>9</sup> et se font donc dans des conditions standardisées définissant les critères de validations demandés par le CST. De ce fait, toutes les études sont validées. La synthèse des protocoles utilisés dans les différentes études se trouve en Annexes XIV et XV.

#### \* Imidaclopride

*En toxicité aiguë (1 administration) par voie orale*, les DL<sub>50</sub> obtenues à 48h par et pour Bayer s'échelonnent de 3,7 à >70,3 ng de matière active par abeille, celles de l'INRA d'Avignon sont de 4,8 et 57 ng d'imidaclopride par abeille selon la race. On relèvera ici la grande variabilité des DL<sub>50</sub> obtenues pour un même produit lors de deux expériences d'un même laboratoire. Par ailleurs cette étude montre une mortalité retardée pour les fortes doses d'imidaclopride. Les DL<sub>50</sub> obtenues par l'INRA de Bures-sur-Yvette s'échelonnent de 9,7 à 70 ng de matière active par abeille.

*En intoxication aiguë par voie topique*, les DL<sub>50</sub> obtenues par et pour Bayer vont de 6,7 à 243 ng de matière active par abeille. Dans le cas des études de l'INRA d'Avignon, les études de toxicité aiguë font apparaître 2 types de courbes : une courbe avec une relation dose/effet habituelle (DL<sub>50</sub> de 50 à 70ng/abeille) et une courbe bi phasique observée dans la majorité des cas et plus particulièrement en intoxication topique. Cette réponse suit une progression de type arithmétique. Pour cette courbe, il a été possible de déterminer 2 DL<sub>50</sub> : une entre 4 et 6 ng/ab environ, la seconde entre 22 et 26 ng/ab.

La sensibilité des abeilles à l'imidaclopride est donc supérieure en ingestion orale par rapport à une intoxication topique.

#### \* Métabolites

Compte tenu du respect des protocoles standardisés, toutes les études sont validées.

Seule la toxicité aiguë par voie orale a été testée avec les métabolites. Seuls deux des métabolites de l'imidaclopride, le 5-hydroxyimidaclopride et le dérivé oléfine présentent une toxicité aiguë pour l'abeille. L'étude de la mortalité des abeilles par intoxication aiguë par quatre autres métabolites (les dérivés 4,5-dihydroxylés, guanidine, urée et l'acide 6-chloronicotinique) n'a montré aucune létalité (DL<sub>50</sub>>1000 ng/abeille) (Suchail, 2001, M47).

<sup>8</sup> Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)

<sup>9</sup> Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)

Les DL<sub>50</sub> à 48h validées pour le dérivé 5-hydroxylé sont de 159 ng/abeille (Bayer), 258 ng/abeille (Suchail) et 153 ng/abeille (Decourtye).

Pour le dérivé oléfine, Bayer observe une DL<sub>50</sub> à 48h >35,7 ng/abeille, Suchail, une DL<sub>50</sub> à 48h de 28 ng/abeille et Decourtye, une DL<sub>50</sub> à 48h de 30±0,1 ng/abeille. Selon ces résultats, l'oléfine semble donc aussi toxique que le produit parent (41 à 57 ng substance active/ab).

### c) Commentaires et perspectives

Les résultats présentés en toxicité aiguë (1 seule administration) par voie orale pour l'imidaclopride sont du même ordre de grandeur avec des DL<sub>50</sub> allant de 4 à 71 ng d'imidaclopride par abeille. Tous les rapports d'études disponibles sont validés.

Plus généralement, les valeurs de DL<sub>50</sub> pour l'imidaclopride sont comprises dans la gamme de valeurs publiées dans la littérature : de 3,7 à >81ng ab (A24, A26, A28, A35).

De même que pour les études de toxicité aiguë par voie orale de l'imidaclopride, la convergence des valeurs de DL<sub>50</sub> obtenues pour le dérivé oléfine (30 ng/abeille) et le dérivé 5-hydroxyle (150-250 ng/abeille) nous permet de les considérer comme valeurs de référence. On soulignera en particulier la toxicité de l'oléfine.

En ce qui concerne les résultats de la toxicité aiguë par voie topique, on obtient des valeurs de DL<sub>50</sub> allant de 6,7 à 240 ng d'imidaclopride par abeille. Toutes les études disponibles sont validées.

On retiendra les caractéristiques de la toxicité aiguë de l'imidaclopride à savoir principalement :

- une mortalité tardive, observée 4 heures après l'intoxication de l'abeille
- la présence de 2 phases ascendantes dans la relation dose-mortalité (courbe bi phasique) pour certaines races d'abeilles (caucasica principalement) en intoxication topique
- une sensibilité à l'imidaclopride plus élevée par voie orale que par contact topique
- la forte évolution de la mortalité au-delà de 24 heures et une mortalité retardée pour de fortes doses.

On regrettera cependant, dans la majorité des études, l'absence d'intervalles de confiance et de tests statistiques permettant de mettre ou non en évidence d'éventuelles différences entre les témoins et les abeilles traitées à différentes doses. De même nous soulignons le fait que seule l'étude M220 utilise deux types de témoins (un vrai témoin avec de l'eau sucrée et un "témoin solvant" avec de l'eau sucrée + de l'acétone produit utilisé pour dissoudre l'imidaclopride). Enfin nous nous interrogeons sur la pertinence de la DL<sub>50</sub> dans le cas d'une colonie d'abeilles dans laquelle une perte de 50 % des abeilles peut entraîner la mort de la colonie entière.

*Les experts du CST s'interrogent sur la nécessité d'une modification des directives OCDE 213 et 214 prenant en compte ces critères statistiques et protocolaires.*

#### 4.1.2 Mortalité suite à une intoxication chronique (administration répétée de la substance active)

Bien que des essais de toxicité chronique ne soient pas obligatoires pour l'autorisation de mise sur le marché d'un pesticide, certaines études se sont néanmoins attachées à tester un éventuel effet mortel lors de l'ingestion répétée, à très faibles dose, d'imidaclopride et de ces dérivés, de manière à mimer la contamination possible des abeilles lors du comportement de butinage et la contamination des abeilles d'intérieur.

## a) Résultats disponibles

\* **Etude de la toxicité de l'imidaclopride et de ses métabolites**

Les résultats dont nous disposons proviennent :

- du laboratoire de Toxicologie Environnementale de l'INRA à Avignon (Suchail, 2001, M47)
- du laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés de l'INRA à Bures-sur-Yvette (Decourtye, 1988, 2002, M13, M257, Pham-Delègue et Cluzeau, 1998, M32 avec les modifications M162 et Pham-Delègue, 2000, M33).
- de laboratoires mandatés par la société Bayer afin d'effectuer des études complémentaires suite aux résultats de Suchail mettant en évidence une toxicité de l'imidaclopride et de ses métabolites lors d'une exposition prolongée (Barth, 2000, M220, M227 ; Bruhnke, 2000, M228 ; Kling, 2000, M222, M224, M230, M231 ; Thompson, 2000, M218, M219, M221, M226 ; Wilhelmy, 2000, M217, M225, M229). Hélas, ces rapports ne concernent que des données de toxicité chronique pour les métabolites urée et acide 6 chloronicotinique.

Les différentes études disponibles sont présentées dans le Tableau XXI et le Tableau XXII

**Tableau XXI : Etudes de la toxicité chronique de l'imidaclopride : mortalité suite à l'administration réitérée d'imidaclopride par voie orale**

Références	Agés abeilles/ Période test/race d'abeilles	Substance testée	Nbre d'abeille	Concentrations testées/ durée de contamination	% de mortalité à 10 jours (selon les concentrations)	NOEC, LOEC DL50
M47, Suchail, 2001 Inra d'Avignon	Variable>20j/Mai- Juillet/ A. m. hybride	Imidaclopride	3 x 30 /doses	0 ; 0,1 , 1, 10 ppb / 10 jours	<15, 50, >70; >70 <sup>#</sup> DL50 = 0,1ppb	DL50=0,1ppb (12 pg/ab/10j)
M13, M32, M162, M165; DeCourtye et al INRA de Bures, 1998 <sup>f</sup>	3 jours,/Mars/ A.m.ligustica	Imidaclopride	50 x 3/doses	0 ; 1,2, 4, 8, 40 ppb / 11 jours	-	LOEC= 8ppb (topique=500ppb) (2864 pg/ab)
M33, M259 <sup>b</sup> , M191 DeCourtye et al INRA de Bures, 2000, Etudes d'hiver	3 jours/Nov-Janvier/ A.m.ligustica	Imidaclopride	60 x 3 /dose	0; 1,5 ; 3 ; 6 ; 12 ; 24 ; 48 ppb /11 jours	11,6*; 12,7 ; 6 ,19,4 ;11,1 ; 16,1 ; 20,5	NOEC= 24ppb (8000pg/ab) ,LOEC=48ppb (16000pg/ab)
M33, DeCourtye et al INRA de Bures, 2000, Etudes d'été	Worker bees, 3 jours/Juin, Juillet/ A.m.ligustica	Imidaclopride	60 x 3 /dose	0, 1,5 ; 3 ; 6 ; 12 ; 24 ;48 ;96 ppb /11 jours	3.3, 8.3, 8.3, 5, 7.2, 7.7, 9.4, 17.7	NOEC= 48ppb (16000pg/ab) LOEC=96ppb (31680pg/ab)
M257 <sup>+</sup> ; DeCourtye INRA de Bures, 2002	Worker bees/-/ A.m.ligustica	Imidaclopride	50 x 2/dose	0, 4, 8 ppb /60j	-	NOEC=4 ppb

- :données manquantes ; <sup>#</sup> : estimations obtenues à partir de graphiques ; <sup>b</sup> problème avec les substances actives qui s'avèrent moins concentrées pour les métabolites et présence d'oléfine et d'hydroxyimidaclopride dans des sirops suggérant la non stabilité des substances dans les sirops de ces études, \* moyenne de 2 lots témoins. <sup>f</sup>problème dans ces études avec la concentration de la solution mère (cf. paragraphe suivant), le tableau tient compte des rectificatifs de concentrations présentés dans le document M162 ; <sup>+</sup> étude non évaluée .

Les NOEC, LOEC et DL50 sont exprimées en ppb et en pg de substance active/abeille pendant 10 jours.

Les études **en blanc** correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant

**Tableau XXII: Etudes de la toxicité chronique des métabolites de l'imidaclopride : mortalité suite à l'administration réitérée d'imidaclopride par voie orale**

Références	Agés abeilles/ Période test	Substance testée	Nbre d'abeille	Concentrations testées/ durée de contamination	% de mortalité à 10 jours (selon les concentrations)	NOEC, LOEC DL <sub>50</sub>
M47, Suchail, Inra Avignon 2001	>20j/Mai- Juillet/variable/ A. m. mellifera et carnica	Hydroxy- imidaclopride	3 x 30 /dose	0, 0,1, 1, 10 ppb / 10 jours	<15; 38 ; 65;60	DL <sub>50</sub> =0,1ppb (12 pg/ab)
		Oléfine			<15; 58; 60; 61	DL <sub>50</sub> =0,1ppb (12 pg/ab)
		Dihydroxy- imidaclopride			<15; 55; 70; 71	
		Dérivé guanidine			<15; 57; 59; 70	
		Acide 6 chloronicotinique			<15; 50; 55; 75	
		Dérivé urée			<15; 52; 65; 79	
M33, M259 <sup>s</sup> , M191 Decourtye, Inra de Bures, 2000, Etudes d'hiver	3 jours/Nov- Janvier/ A.m.ligustica	Hydroxy- imidaclopride	60 x 3 /dose	0,7,5; 15; 30;60;120; 240 ppb/11 jours	13,3* ; 8,3 ;13,3 ; 19,4 ; 10,5 ;26,6 ; 41,1	NOEC=120 ppb, 40000pg/ab LOEC=240 ppb 80000pg/ab
		oléfine		0,1,4; 2,8; 5,6; 11,2; 22,5; 45 ppb/11 jours	9,4 ;13,3 ;18,3 ;11,1 ;28,8 ; 15,5 ; 7,2	Pas effets oléfine
M221 ; Thompson, 2000	2 jours à 3 semaines/ mai/ A.m.ligustica	Dérivée urée	5 x 10 /doses	0 ; 0,1; 1; 10 ppb/ 10 jours	50, 46, 34, 44	1332pg/ab
M226 ; Thompson, 2000		Acide 6 chloronicotinique			54 ;58 ; 58 ; 52	
M222 ; M224, Kling, 2000	Foraging bees (22-45j)/mai/ A.m.carnica	Dérivé urée	5 x 10 /dose	0, 0,1; 1; 10 ppb/ 10jours*	20, 34, 20, 16 (Foraging))*	
	Hive bees (5j)/mai/ A.m.carnica				0 ; 8 ; 6 ; 0 (Hive)	NOEC>10 ppb (4310 pg/ab)
M230 ; M231 ; Kling, 2000	Foraging bees (22-45j)	Acide 6 chloronicotinique	3 x 10/ doses	0, 0,1; 1; 10 ppb/ 10 jours*	20 ; 8 ; 10 ; 6 *(Foraging)	NOEC>10 ppb 4676pg/ab
	Hive bees (5 jours) / mai/ A.m. carnica		5 x 10/dose		0 ; 2 ; 4 ; 0 (hives)	NOEC>10 ppb 2740pg/ab
M223 ; Barth, 2000	Field bees / Mai/ A.m. carnica	Dérivée urée	5 x 10 /dose	0, 0,1; 1; 10 ppb/ 10 jours*	44 ;26 ; 36 ; 36	NOEC>10 ppb (7266pg/ab)
	House bees / Mai/ A.m. carnica				4 ; 10 ; 8 ; 12	NOEC >10ppb (7301pg/ab)
M227 ; Barth, 2000	Field bees / Mai/ A.m. carnica	Acide 6 chloronicotinique	5 x 10 /dose	0, 0,1; 1; 10 ppb/ 10 jours*	44 ; 30 ; 40 ; 32	NOEC>10 ppb (8056 pg/ab)
	House bees / Mai/ A.m. carnica				4 ; 10 ; 4 ; 6	NOEC >10ppb (7242pg/ab)

**Tableau XXIII: Etudes de la toxicité chronique des métabolites de l'imidaclopride : mortalité suite à l'administration répétée d'imidaclopride par voie orale (suite)**

Références	Agés abeilles/ Période test	Substance testée	Nbre d'abeille	Concentrations testées/ durée de contamination	% de mortalité à 10 jours (selon les concentrations)	NOEC, LOEC DL <sub>50</sub>
M225, Wilhelmy, 2000	Worker Bees (12-17jours) / Mai/ A.m. carnica	Dérivée urée	3 x 10/ dose	0, 0,1; 1; 10 ppb/ 10 jours	10, 37 ; 3 ; 63	NOEC>10ppb (3670pg/ab)
	Foraging bees (22-45jours) Mai/ A.m. carnica				30; 60; 50; 60	NOEC>10ppb 4477pg/ab
M229 <sup>+</sup> , Wilhelmy, 2000	Worker Bees (12-17jours)	Acide 6 chloronicotinique	3 x 10/ dose	0, 0,1; 1; 10 ppb/ 10 jours	10; 67; 77; 97	NOEC>10ppb 3880pg/ab
	Foraging bees (22-45jours) Mai/ A.m. carnica				30; 77; 70; 73	NOEC>10ppb 4040pg/ab
M228 ; Bruhnke, , 2000	Worker Bees (12-17jours) Mai/ A.m. carnica	Acide 6 chloronicotinique	3 x 10/ dose	0, 0,1; 10 ppb/ 10 jours	7; 10; 7; 7	NOEC>10ppb 5800pg/ab

- : Données manquantes ; # : estimations obtenues à partir de graphiques ; <sup>s</sup> problème avec les substances actives qui s'avèrent moins concentrées pour les métabolites et présence d'oléfine et d'hydroxyimidaclopride dans des sirops suggérant la non stabilité des substances dans les sirops de ces études ; \* arrêt de l'expérience à 4 jours en raison de la forte mortalité des témoins; + : études invalidées par Bayer en raison de la répartition non aléatoire des abeilles.

Les NOEC, LOEC et DL50 sont exprimées en ppb et en pg de substance active/abeille pendant 10 jours.

Les études **en blanc** correspondent aux résultats validés décrits dans le paragraphe suivant

#### b) Critères de validation

Contrairement aux essais de toxicité aiguë qui sont requis pour l'autorisation de mise sur le marché d'un pesticide et pour lesquels des protocoles standardisés existent, les essais de toxicité chronique ne sont pas demandés et aucun protocole standardisé n'a été mis au point. En l'absence de directive spécifique, nous avons choisi de nous référer aux lignes directives OEPP/Eppo 2001, publiées par le groupe de travail "bee protection" de la commission internationale ICPBR (International Commission for Plant Bee Relationships) et à la méthode N°95 établie par les membres de la commission des Essais Biologiques (CEB) de l'association Française de Protection des Plantes :

- **N°1** : les abeilles doivent être maintenues dans des conditions se rapprochant des conditions environnementales (pas être issues de rucher chauffé) : à l'obscurité en enceinte climatisée à 25°C±2°C et à une humidité relative comprise entre 50 et 70%.
- **N°2** : l'âge, la race d'abeille doivent être indiqués ainsi que la méthode de collecte, d'échantillonnage et la date d'expérimentation.
- **N°3** L'unité expérimentale est une cage de 10 abeilles. Chaque test doit comporter un traitement témoin, un traitement avec chaque dose de substance active à tester (3 concentrations différentes minimum). Chaque modalité de traitement comprend au minimum 3 cages d'abeilles, les tests sont répétés au minimum 3 fois. Le test doit se dérouler sur une durée d'environ 10 jours
- **N°5** La mortalité constitue la variable dépendante, elle doit être enregistrée régulièrement (au minimum toutes les 24 heures) afin d'évaluer son évolution au cours du temps. Dans les cages témoins, elle doit être inférieure ou égale à 15% de la population initiale d'abeilles après 10 jours

de traitement. Ceci implique l'utilisation de colonies en bon état physiologique. Les résultats doivent être libellés en DL50 10jours. Les données brutes doivent figurer dans le compte-rendu du test.

### c) Etudes validées

En l'absence de protocole standardisé, chaque laboratoire a élaboré le sien. Ceci nous a amené à examiner soigneusement les protocoles d'études et à demander par écrit des précisions aux auteurs (Annexes XVI, XVII, XVIII, XIX) Grâce aux différentes réponses, nous avons établi une synthèse des protocoles pour les différentes études (cf. Annexes XX et XXI). Malgré ces différences de protocoles, les différents types d'études ne s'excluent pas nécessairement. Elles peuvent refléter des différences de sensibilité des abeilles, en particulier selon leur âge, leur race et/ou leur colonie, etc.

Pour toutes les études, des abeilles ont été nourries pendant 10 à 11 jours avec du sirop contaminé à l'imidaclopride, fourni *ad libitum* et renouvelé quotidiennement. Les quantités réellement ingérées sont évaluées chaque jour, par différence de pesée ou de volume, et ramenées à une valeur par abeille en fonction du nombre d'abeilles vivantes au jour considéré (à l'exception des études de Wilhelmy - M225, M229- et Bruhnke M228 où l'évaluation est effectuée tous les 2 jours et la quantité de sirop ingéré calculée en fonction du nombre d'abeilles vivantes au premier jour de l'expérience). La quantité de sirop consommée par abeille et par jour ne varie pas significativement au cours du test et elle est semblable pour les témoins et les traités. Les cagettes sont maintenues à l'obscurité pendant toute la durée des essais, sauf pendant l'évaluation de la mortalité.

#### \* Etude de la toxicité de l'imidaclopride

Dans les études de l'Inra d'Avignon (M47) et de Bures (études dites « d'été » M33), le nombre d'abeilles utilisées, les modalités de traitement ainsi que le pourcentage de mortalité des témoins au bout de 10 jours sont conformes aux critères de validations établis par les membres du CST. Un test statistique a également été utilisé pour déterminer les différences significatives de mortalité entre les différentes doses (ANOVA pour Avignon et test du Khi 2 pour l'INRA de Bures). Les abeilles utilisées dans ces 2 études sont d'âges et de races différentes (hybride d'âge variables (>20jours) pour les études de l'INRA d'Avignon et *Apis mellifera ligustica* de 3 jours pour les études de l'INRA de Bures (M33 études d'été). Dans l'étude d'Avignon, la concentration des sirops n'a pas été vérifiée mais de nombreuses précautions ont été prises dans l'élaboration du protocole : protection des sirops de la lumière, calculs des coefficients d'extinction molaire, conditions d'exposition se rapprochant des conditions environnementales (10h d'exposition à du sirop contaminé, 14heures à du sirop sain) etc..... Pour l'étude de Bures dite « d'été », la concentration en imidaclopride n'a pas été vérifiée contrairement à celle des études dites « d'hiver ». Néanmoins, les dosages d'hiver ne montrant pas de phénomènes importants de dégradation, le protocole de préparation et de stockage de la solution étant identique dans les 2 études, les experts du CST considèrent comme valides les teneurs en imidaclopride annoncées dans les études dites d'été. La température de maintenance des abeilles de Bures est légèrement supérieure à 30°C, les experts du CST ne considèrent pas ce point comme pouvant être, à lui seul, un facteur d'invalidation. De ce fait, ces 2 études répondent aux critères de validations émis et valident leurs résultats. Les études d'Avignon (M47) montrent qu'à la concentration de sirop la plus faible testée (0,1 ppb), on observe 50% de mortalité au bout de 10 jours, soit une quantité cumulée ingérée de 12 pg par abeille sur 10 jours. Dans les études d'été de Bures-sur-Yvette de 2000 (M33), la plus faible dose testée, entraînant 20% de mortalité, est de 32000 pg/ab/10jours en été (quantités cumulées : 32 ng). La dose sans effet est de 16 000 pg/ab/10jours. Il existe donc un facteur 1000 entre la plus faible dose testée à Avignon (50% de mortalité) et la plus faible dose présentant un effet lors des essais d'été à Bures-sur-Yvette (20% de mortalité). Ce facteur est de 3000 lorsque l'on considère les doses cumulées ingérées

A l'inverse, les 3 autres études de l'INRA de Bures (M13, M33 étude « d'hiver », M257) ne sont pas validées pour les raisons suivantes :

- La solution mère supposée à 100 ppb ayant servi à préparer tous les sirops en 1998 (M13, M32) a été analysée par le GIRPA d'Angers à la suite d'une demande de Bayer. L'analyse par HPLC-UV a montré une concentration réelle proche de 500 ppb, ce qui a amené les auteurs à faire un rectificatif (M162) des données initialement publiées (M13, M32). Un facteur 5 dans ce sens paraît important, mais il faut savoir que, d'une part, la technique d'Angers mesure l'imidaclopride et tous ses métabolites, et d'autre part, cette analyse a été effectuée plusieurs mois après les tests. Les conditions de conservation de la solution ne peuvent assurer qu'il n'y a pas eu évaporation du cosolvant. Ceci, associé à des protocoles en cours de mise au point, a conduit les auteurs à ne pas considérer comme fiables les résultats de 1998 (communication personnelle de M Decourtye). Cette étude est donc considérée comme non valide.

- La vérification des concentrations en imidaclopride des sirops testés (solutions finales) a été effectuée pour les études d'hiver présentées dans le rapport M33 (Pham-Delègue, 2000). Ces analyses ont été faites au CHU de Limoges grâce à un couplage HPLC-MS/MS, technique de dosage validée par le CST. Néanmoins, ces études d'hiver se déroulent en rucher chauffé. Ces abeilles ne sont pas en vraies conditions d'hiver et ne correspondent pas non plus à des vraies abeilles d'été, ces conditions expérimentales ne sont pas représentatives des conditions environnementales naturelles. Nous invalidons donc, sur ce critère, cette étude.

- Enfin, l'étude M257 ne correspond pas à une étude de toxicité chronique « classique ». Cette étude tentait de développer un modèle statistique de la dynamique de la mortalité chez l'abeille domestique prenant en compte différents paramètres tels l'histoire individuelle de chaque individu d'un même groupe, la dépendance des abeilles entre elles etc... De ce fait, cette étude s'est déroulée sur 60 jours ce qui correspond en moyenne à la durée de vie des abeilles dans ces conditions expérimentales. Par ailleurs, le but de l'étude n'étant pas de déterminer le pourcentage de mortalité après 10 jours d'exposition à l'imidaclopride, les données correspondantes à notre problématique manquent. Dans ces conditions très spécifiques, nous ne pouvons évaluer cette étude.

#### \* *Etude de la toxicité des métabolites de l'imidaclopride*

La toxicité chronique (administration répétée) des métabolites de l'imidaclopride (hydroxyimidaclopride, dihydroxyimidaclopride, oléfine, dérivé guanidine, acide 6-chloronicotinique et dérivée urée) a également été testée.

Si les études d'Avignon s'intéressent à tous les dérivés sus cités, l'INRA de Bures n'a étudié que les 2 composés supposés les plus toxiques : le dihydroxyimidaclopride et l'oléfine.

Les rapports des laboratoires mandatés par la société Bayer suite aux résultats de Suchail, ne concernent que les données de toxicité subchronique pour le dérivée urée et l'acide 6 chloronicotinique.

Les études de l'Inra d'Avignon (Suchail, 2001, M47) et de Bures (M33, M259, 2000, Decourtye) ont été effectués en même temps que celles sur l'imidaclopride, les mêmes protocoles ont donc été utilisés (Annexe XXI). Pour les mêmes raisons précédemment citées, l'étude de l'Inra d'Avignon (Suchail, 2001, M47) est donc validée, l'étude dite « d'hiver » de l'Inra de Bures est invalidée. L'étude d'Avignon montre les mêmes effets létaux qu'avec l'imidaclopride (mêmes concentrations testées, mêmes taux de mortalité) avec les 6 dérivés de l'imidaclopride, qu'ils se soient montrés actifs en toxicité aiguë (5-hydroxyimidaclopride, oléfine) ou non (4,5-hydroxyimidaclopride, acide 6-chloronicotinique, dérivées urée et guanidine). Un effet dose a été démontré avec l'hydroxyimidaclopride. La moitié des abeilles meurent (DL50) dès 0,1 ppb de métabolites, ce qui correspond à 1,2pg/ab/jour de substance.

A l'exception des études de Thompson (2000, M221, M226) et Bruhnke (2000, M228), les études commanditées par Bayer testent le dérivée urée et l'acide 6 chloronicotinique sur 2 catégories d'abeilles : des butineuses et des ouvrières d'intérieur. Systématiquement, les études sur butineuses

(Kling, M222, M230 ; Barth, M223, M227) montrent une mortalité très importante des témoins (20 à 45%). Elles ne peuvent par conséquent pas être validées selon les critères du CST. Par ailleurs, les

études de Wilhelmy, quel que soit l'âge des abeilles (M225, M229) sont invalidées à posteriori par l'auteur en raison d'une non répartition aléatoire des abeilles en début d'expérience. Dans ces études une forte mortalité est observée dans les groupes ayant été prélevés en dernier et qui correspondent également aux plus fortes doses testées. Il nous semble difficile d'imaginer qu'une répartition non aléatoire des abeilles soit la seule responsable d'une mortalité accrue. Nous retiendrons cependant ce critère d'invalidation mais soulignons que ce sont les seules études qui semblaient montrer un effet toxique des métabolites. Les études de Thompson (M221, M226) utilisent des abeilles d'âges variés (2 à 3 semaines) mais là encore, le pourcentage de mortalité des témoins au bout de 10 jours atteint 50%, quel que soit le métabolite testé. Ces 2 études sont donc également invalidées.

Les études portant sur des abeilles d'intérieur (Kling, M224, M231 ; Barth M223, M227; Bruhnke M228), présentent toutes une mortalité des témoins inférieure à 15% au bout de 10 jours.

Elles répondent donc au critère de validation déterminé par le CST. On notera néanmoins que dans les études de Bruhnke le relevé de mortalité et le changement de sirop n'a lieu que tous les deux jours. Aucune de ces études validées ne révèle d'effet significatif entre les abeilles témoins et les abeilles traitées, quelle que soit la dose de métabolites ingérée. Aucun effet toxique n'ayant été démontré aux doses testées, les études demandées par la société Bayer nous permettent seulement de conclure à une NOEC validée supérieure à 10 ppb.

#### d) Commentaires et perspectives

Malgré les nombreux travaux cherchant à démontrer ou non un effet toxique de l'imidaclopride (7 études) et de ces métabolites (13), nous n'obtenons que des résultats très partiels, seuls quelques résultats ayant pu être validés. Par ailleurs une grande disparité des résultats a été observée dans les données de toxicité chronique (suite à des administrations répétées de substances actives), disparité pouvant s'expliquer, entre autres, par les différences de protocoles, synthétisées dans les Annexes XX et XXI.

Parmi celles-ci nous citerons, entre autres :

- l'âge des abeilles : les études de Kling et de l'Inra de Bures utilisent des abeilles ayant été prélevées à l'émergence et donc d'âge connu et homogène, les études de l'Inra d'Avignon et de certains laboratoire commandités par Bayer (cf. annexe XXI) utilisent des abeilles plutôt jeunes mais d'âges variés, prélevées sur les cadres, enfin d'autres études commanditées par Bayer utilisent également des abeilles prélevées à l'entrée de la ruche, supposées être des abeilles butineuses de plus de 3 semaines. A ce titre nous remarquerons que les études sur butineuses présentent un fort taux de mortalité chez les témoins, elles ne sont donc pas recommandées. Par ailleurs, le choix de l'âge des abeilles dépend de l'effet à démontrer. Si l'on cherche à démontrer un effet général d'un pesticide sur la colonie, mieux vaut prendre des abeilles d'âges variés, pour l'étude d'un effet sur une classe particulière d'abeille, le choix du prélèvement à l'émergence donc d'abeille de même âge paraît plus judicieux.

- la race des abeilles : l'Inra de Bures a choisi des abeilles de la race *ligustica*, l'INRA d'Avignon a travaillé avec un hybride tandis que les laboratoires commandités par Bayer ont choisi *Apis mellifera carnica*.

- l'anesthésie : l'utilisation d'abeilles prélevées sur cadre nécessite souvent une anesthésie, ce qui n'est pas le cas des abeilles prélevées à l'émergence. Ainsi l'INRA d'Avignon anesthésie les abeilles, de même que Thompson. On remarquera, que chez cet auteur, les abeilles témoins montrent un pourcentage de mortalité important. On peut se poser la question d'une sensibilisation des abeilles lors de l'anesthésie bien que les résultats de l'Inra d'Avignon ne soient pas en accord avec cette hypothèse. Lors de son audition par le CST, M Belzunces souligne cependant la nécessité d'un temps d'anesthésie court.

- l'utilisation d'un cosolvant : aucune des études demandées par Bayer n'utilise de cosolvant pour solubiliser l'imidaclopride (solubilité dans l'eau 0,58g/l). L'Inra d'Avignon a utilisé du DMSO à 0,1% et celui de Bures de l'acétone à 1% (M33, M259).

- le calcul de la mortalité : les études de l'Inra d'Avignon et de Barth utilise la correction d'Abott pour le calcul du pourcentage de la mortalité, contrairement aux autres études.

Si ces différences de protocole peuvent expliquer la disparité des résultats obtenus, on soulignera néanmoins, qu'une importante variabilité est courante dans le monde des abeilles.

En ce qui concerne les études de toxicité chronique de l'imidaclopride, seules deux études (M47, Suchail et M33 études d'été, Decourtye) ont été validées. L'étude de l'Inra d'Avignon permet de conclure à une DL50 de 12 pg/ab/10jours, celle de l'Inra de Bures à une NOEC de 16 000pg/ab/10jours et à une LOEC à 31 680pg/ab/10jours.

En ce qui concerne les études validées (6) de toxicité chronique des métabolites de l'imidaclopride, les études d'Avignon (Suchail, 2001, M47) montrent les mêmes effets létaux qu'avec l'imidaclopride (mêmes concentrations testées, mêmes taux de mortalité) avec 6 dérivés de l'imidaclopride, qu'ils se soient montrés actifs en toxicité aiguë (5-hydroxyimidaclopride, oléfine) ou non (4,5-hydroxyimidaclopride, acide 6-chloronicotinique, dérivées urée et guanidine). Une mortalité de 50% est obtenue avec une ingestion quotidienne par abeille de 1,2 pg d'imidaclopride ou de ses dérivés pendant 10 jours. L'auteur explique ces résultats par l'interaction de la partie 6-chloronicotinyl avec un récepteur spécifique supposé ce qui a conduit la société Bayer à demander aux quatre laboratoires sus cités des études complémentaires avec le dérivée urée et l'acide 6 chloronicotinique. On remarquera que ces 2 métabolites ne sont pas ceux pour lesquels Suchail (2001, M47) et Decourtye (2000, M191) ont démontré respectivement des effets en toxicité aiguë (1 seule administration) et chronique (administration répétée). On souligne que cette firme n'a pas effectué d'études de toxicité chronique de l'imidaclopride en raison des résultats de DeCourtye (M33) déjà existants mais a vérifié ceux de Suchail. La seule étude d'un laboratoire commandité par Bayer qui montre une mortalité des abeilles supérieure à 50% pour des concentrations de 0,1 ppb de dérivée urée et d'acide 6 chloronicotinique est invalidée par les auteurs pour cause de non répartition aléatoire des abeilles. Certaines de ces études commanditées par Bayer ont été validées par le CST et ne démontrent pas d'effet significatif du dérivé urée et de l'acide 6 chloronicotinique sur la mortalité des abeilles en intoxication chronique. Elles nous permettent simplement de conclure à une NOEC supérieure à 10 ppb pour ces métabolites. On s'interrogera également sur le choix des tests statistiques utilisés (Tests de Student dans la majorité des cas) qui ne sont pas forcément valides d'un point de vue analytique et ne prennent pas en compte la répétition de l'intoxication au cours du temps.

En conclusion, les résultats valides dont nous disposons sur la toxicité suite à l'administration répétée de l'imidaclopride et de ces métabolites montrant un effet en toxicité aiguë (hydroxyimidaclopride et oléfine) reposent respectivement sur deux et une étude, ce qui nous semble insuffisant pour conclure. Par ailleurs, nous noterons qu'il n'existe, à notre connaissance, aucune étude concernant l'évaluation de la mortalité par intoxication chronique par voie topique.

Le CST juge nécessaire *de faire des expériences supplémentaires en utilisant un protocole standardisé et en cherchant à répondre à des questions précises pour la définition des conditions d'études (intoxication par du pollen des abeilles jeunes restant dans la ruche ou intoxication par du nectar des butineuses allant à l'extérieur de la ruche).*

## 4.2 Effets sublétaux de l'imidaclopride et de ses dérivés sur les abeilles

La plupart des études présentées ci-après ont utilisé des petits groupes d'abeilles ou des colonies. Les protocoles font état de concentrations d'imidaclopride contenues dans les sirops sans toujours préciser la quantité de sirop prélevé par abeille individuelle. Or, afin de comparer les LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) et NOEC (*No Observed Effect Concentration*) des effets sublétaux aux valeurs de la DL50, exprimées en poids d'imidaclopride par abeille, il nous faut connaître la quantité d'imidaclopride prélevée par abeille. Dans certains cas, les quantités d'imidaclopride prélevées par abeille sont connues, c'est à dire préalablement déterminées par les auteurs des études (dans les tableaux de résultats ces valeurs sont suivies de la mention <sup>(1)</sup>), mais dans la majorité des cas, elles ne sont pas connues. Pour ces dernières études, nous avons donc été amenés à estimer nous-mêmes les quantités d'imidaclopride prélevé par abeille à partir des quantités moyennes connues de nectar consommé par abeille et par jour (dans les tableaux de résultats ces valeurs sont suivies de la mention <sup>(2)</sup>), celles-ci sont de 25 à 70 mg par butineuse (Belzunces et Taséi 1997, M46 ; Winston 1987 A85).

Nous ne disposons pas de directive officielle pour les évaluations des études sur les effets sublétaux. Par conséquent, nous avons choisi des critères d'évaluation qui reprennent en partie ceux proposés par l'OEPP (2001), *Organisation Européenne pour la Protection des Plantes*, qui se charge de publier des directives proposées par le groupe de travail « Bee Protection » de la commission internationale ICPBR, *International Commission for Plant Bee Relationships*. Ces directives proposent des méthodes d'évaluation de la toxicité et des risques des insecticides pour les abeilles (tests conduits en laboratoire pour détermination des DL50 par contact et par ingestion, et de tests conduits en cage de vol, sous tunnels et en plein champ).

Les résultats présentés ci-dessous proviennent d'expériences qui ont observé et mesuré les effets sublétaux de l'imidaclopride et de ses métabolites sur les abeilles – suite à une (mode aiguë) ou plusieurs administrations (mode chronique) - par voies orale et topique - en laboratoire (Tableau XXIV à Tableau XXVIII), en cage de vol (Tableau XXX), sous tunnels (Tableau XXXI à Tableau XXXIV) et en plein champ (Tableau XXXVI à Tableau XXXIX). Dans ces tableaux, si toutes les concentrations testées mènent à un effet ou, au contraire, si aucune des concentrations testées ne mène à un effet, ceci est signalé par un signe "-" dans la colonne correspondante.

Ces analyses ont porté sur l'évaluation de divers comportements : la coordination motrice, la mobilité, l'apprentissage, la mémoire, l'orientation, le butinage, les danses, la ponte, la récolte du pollen et du nectar, et la production de miel et de cire.

### 4.2.1 Etudes menées en laboratoire

#### a) Résultats disponibles

##### \* Liste des études :

Au total, l'analyse des effets sublétaux en laboratoire porte sur 33 études :

- 8 études portent sur les effets comportementaux observés suite à une intoxication aiguë par voie orale à l'imidaclopride (Barth 2000, M220 ; Colin 1998, M32, M115, M233, M238 ; Decourtye et Pham-Délègue 1998, M13, M32, M232 ; Kirchner 1999, M12, M14, M40 ; Schmitzer 1999, M6 ; Schmuck et Schöning 1999, M9 ; Thompson 2000, M219 ; Wilhelmy 2000, M217) (cf. Tableau XXIV)
- 2 études portent sur les effets comportementaux observés suite à une intoxication aiguë par voie orale par les métabolites de l'imidaclopride (Kirchner 1999, M12, M14, M40 ; Schmitzer 1992, M134) (cf. Tableau XXV).
- 4 études portent sur les effets comportementaux observés suite à une intoxication chronique de l'imidaclopride (Colin 1998, M32, M115, M233, M238 ; Decourtye et Pham-Délègue 1998, M13,

- M32, M232 ; Pham-Délègue et Decourtye 2000, M33 ; Kirchner 1999, M12, M14, M40) (cf. Tableau XXVI).
- 10 études portent sur les effets comportementaux observés suite à une intoxication chronique par les métabolites de l'imidaclopride (Barth 2000, M223 et M227 ; Bruhnke 2000, M228 ; Kling 2000, M222 et M224 ; Pham-Delègue et Decourtye 2000, M33 ; Thompson 2000, M221 et M226 ; Wilhelmy 2000, M225 et M229) (cf. Tableau XXVII)
- 9 études portent sur les effets comportementaux observés suite à une administration par voie topique de l'imidaclopride (Armengaud *et al.* 2002, A36 ; Barth 2000, M220 ; Belzunces et phasique 2001, M53 partie 4 ; Colin *et al.* 1998 et 1999, M32, M115, M232, M238 ; Decourtye et Pham-Délègue 1998, M13, M32, M232 ; Drescher 1990, M32 ; Guez *et al.* 2001, A31 ; Thompson 2000, M218 ; Wilhelmy 2000, M217) (cf. Tableau XXVIII).

\* **Effets mesurés :**

- **L'effet « knockdown ».** Il est défini comme une paralysie complète et une mort apparente de l'individu, qui ne se distingue de la vraie mort que par sa réversibilité (Colin *et al.* 1998, M32, M232, M233, M238; 1999, M115).
- **La coordination motrice.** Elle peut être perturbée par des tremblements du corps suivis d'apathie.
- **Le REP, Réflexe d'Extension du Proboscis.** Il permet d'évaluer les capacités de mémorisation et d'apprentissage olfactif suite à un conditionnement.
- **La prise alimentaire** est mesurée comme la quantité de sirop ou de pollen prélevée par les abeilles. Il convient de distinguer ce qui est prélevé de ce qui est réellement ingéré par l'abeille. En effet, la quantité de sirop prélevée par une abeille n'est pas automatiquement ingérée car elle peut être stockée plusieurs heures dans son jabot, et être régurgitée dans la colonie (trophallaxie, stockage dans les alvéoles, etc.). Par conséquent, les études qui portent sur le court terme mesurent plutôt des quantités prélevées qu'ingérées par abeille alors que les études qui portent sur le long terme permettent d'estimer une quantité réellement absorbée par abeille.
- **La reconnaissance entre congénères ou apparentés**
- **La production de cire**

\* **Les résultats :****Tableau XXIV : Etudes en laboratoire des effets sublétaux engendrés par une 1 seule administration d'imidaclopride par voie orale (intoxication aiguë)**

Auteurs, Année / Référence	Durée de traitement <sup>+</sup> , délai d'observation*	Effets observés	NOEC	LOEC
Barth, 2000 / M220	4, 24 et 48 h*	Effet knockdown et coordination motrice	9 ng/ab <sup>1</sup>	27 ng/ab <sup>1</sup>
Colin, 1998 / M32, M115, M233, M238	Quelques heures à 24 h*	Quantité de sirop ingérée	3,3 ng/ab <sup>1*</sup> (50ppb)	3,3 ng/ab <sup>1*</sup> (100ppb)
		Effet knockdown	-	5,8 ng/ab <sup>1*</sup> (200ppb)
Decourtye et Pham Délégué, 1998 / M13, M32, M232	Environ 2 h <sup>+</sup> , *	REP	9,9 ng/ab <sup>1</sup> (300ppb)	-
Kirchner, 1999 / M12 partie II Kirchner, 2000 / M14 partie II ou M40	Quelques minutes <sup>+,*</sup>	REP	<u>1,25</u> à 3,5 ng/ab <sup>2</sup> (50ppb)	2,5 à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100ppb)
Schmitzer, 1999 / M6 Schmuck et Schöning, 1999 / M9	< 3h <sup>+</sup> et 1, 2, 4, 24, 48, 72 et 96 h*	Coordination motrice	1,5 ng/ab <sup>1</sup>	3,1 ng/ab <sup>1</sup>
Thompson, 2000 / M219	4, 24 et 48 h*	Effet knockdown et coordination motrice	8,2 ng/ab <sup>1</sup>	24,6 ng/ab <sup>1</sup> (dés 4h)
Wilhelmy, 2000 / M217	4, 24, 48 et 96 h*	Effet knockdown et coordination motrice	<u>0,94</u> ng/ab <sup>1</sup>	34,7 ng/ab <sup>1</sup>

La quantité de sirop ingérée varie en fonction de la dose testée (66 mg/ab pour 50 ppb ; 33 mg/ab pour 100 ppb et 29 mg/ab pour 200 ppb).

Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés.

**Tableau XXV : Etudes en laboratoire des effets sublétaux engendrés par une 1 seule administration des métabolites de l'imidaclopride par voie orale (intoxication aiguë)**

Auteurs, Année / Référence	Durée de traitement <sup>+</sup> , délai d'observation*	Effets observés	Métabolites	NOEC	LOEC
Kirchner, 1999 / M12 partie II Kirchner, 2000 / M14 partie II ou M40	Quelques minutes <sup>+,*</sup>	REP	Oléfine	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100ppb)	12,5 à 35 ng/ab <sup>2</sup> (500ppb)
			Dihydroxy-imidaclopride	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100ppb)	5 à 14 ng/ab <sup>2</sup> (2000ppb)
Schmitzer, 1992 / M135	96 h <sup>+,*</sup>	Effet knockdown et coordination motrice	5-hydroxy-imidaclopride	<u>1,2</u> ng/ab <sup>1</sup>	4,6 ng/ab <sup>1</sup>

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis.

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités connues<sup>1</sup> ou estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère.

Les parties **blanches** correspondent aux résultats validés.

**Tableau XXVI : Etudes en laboratoire des effets sublétaux engendrés par une administration réitérée d'imidaclopride par voie orale (intoxication chronique)**

Auteurs, Année / Référence	Durée de traitement <sup>+</sup> , délai d'observation *	Effets observés	NOEC	LOEC
Colin, 1998 / M32, M115, M233, M238	5 jours*	Consommation de pollen et production de cire	-	<u>0,31</u> à 0,87 ng/ab <sup>2</sup> (12,5ppb)
	> 1 mois*	Reconnaissance entre apparentés	-	<u>0,25</u> à 0,7 ng/ab <sup>2</sup> (10ppb)
Decourtye et Pham Délègue, 1998 / M13, M32, M232	11 jours <sup>+,*</sup>	REP	-	0,13 ng/ab <sup>1</sup> (4ppb)
Pham-Delègue et Decourtye, 2000 / M33 Partie I  Partie II	11 jours <sup>+,*</sup>	Quantité de sirop ingérée, études d'hiver	1,6 ng/ab <sup>1</sup> (48ppb)	-
		REP, études d'hiver	0,8 ng/ab <sup>1</sup> (24ppb)	1,6 ng/ab <sup>1</sup> (48ppb)
		REP, études d'été	<u>0,2</u> ng/ab <sup>1</sup> (6ppb)	0,4 ng/ab <sup>1</sup> (12ppb)
Kirchner, 1999 / M12 partie II Kirchner, 2000 / M14 partie II ou M40	10-12 jours <sup>+,*</sup>	REP	0,25 à 0,7 ng/ab <sup>2</sup> (10ppb)	-

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis. Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités mesurées<sup>1</sup> ou estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les parties **blanches** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXIX).

**Tableau XXVII : Etudes en laboratoire des effets sublétaux engendrés par une administration réitérée des métabolites de l'imidaclopride par voie orale (intoxication chronique)**

Auteurs, Année / Référence	Durée de traitement <sup>+</sup> , délai d'observation*	Effets observés	METABOLITES	NOEC	LOEC
Barth, 2000 /M227	Toutes les 24 h pendant 10 jours <sup>+, *</sup>	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	<b>0,007 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(0,1ppb)</b>	-
Barth, 2000 /M223	Toutes les 24 h pendant 10 jours <sup>+, *</sup>	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	<b>0,008 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(0,1ppb)</b>	-
Bruhnke, 2000 /M228	2, 4, 6, 8, 10 j <sup>+, *</sup>	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	-	<b>0,0022 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(0,1ppb dès le 6<sup>e</sup> jour)</b>
Kling, 2000 /M222	Tous les jours X 4 j <sup>+, *</sup>	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	<b>0,0075 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(0,1ppb)</b>	-
Kling, 2000 /M224	Tous les jours X 4 j et ensuite tous les 2 jours X 6 j	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	-	-
Pham-Delègue et Decourtye, 2000 / M33 Partie I	11 jours <sup>+, *</sup>	Quantité de sirop ingérée, études d'hiver	Oléfine	<b>1,5 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(45ppb)</b>	-
			Hydroxy-imidaclopride	<b>0,5 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(15ppb)</b>	<b>1 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(30ppb)</b>
		REP, études d'hiver	Oléfine	<b>1,5 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(45ppb)</b>	-
			Hydroxy-imidaclopride	<b>2 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(60ppb)</b>	<b>4 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(120ppb)</b>
Thompson, 2000 /M226	2, 4, 6, 8, 10 j <sup>+, *</sup>	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	-	<b>0,008 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(dès le 1<sup>e</sup> jour)</b>
Thompson, 2000 /M221	Tous les jours pendant 10 jours	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	-	<b>0,008 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(dès le 3<sup>e</sup> jour)</b>
Wilhelmy 2000 /M225	2, 4, 6, 8, 10 j	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	-	<b>0,004 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(0,1ppb dès le 6<sup>e</sup> jour)</b>
Wilhelmy 2000 /M229	2, 4, 6, 8, 10 j	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	-	<b>0,004 ng/ab<sup>1</sup></b> <b>(0,1ppb dès le 6<sup>e</sup> jour)</b>

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis. Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités connues<sup>1</sup> ou estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les parties **blanches** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXIX).

**Tableau XXVIII : Etudes en laboratoire des effets sublétaux engendrés par une ou plusieurs administrations d'imidaclopride par voie topique**

Auteurs, Année / Référence	Méthode d'application	Délais d'observation	Effets observés	NOEC	LOEC
Armengaud <i>et al.</i> , 2002 / A36	1 application sur le thorax	15, 30, 60 min	Seuil du REP	<b>2,5 ng/ab<sup>1</sup></b>	<b>5 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 1 h)
			Fréquence des mouvements : 1/-Augmentation 2/-Diminution (effet knockdown)	-	<b>1/-1,25 ng/ab<sup>1</sup></b> ( indép. temps) et <b>2,5 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 15 mn) <b>2/-5 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 30 mn)
			Habitude du REP	-	<b>1,25 ng/ab<sup>1</sup></b> (pas effet temps)
Barth, 2000 /M220	1 application sur la partie ventrale du thorax	4, 24, 48 et 96 h	Effet knockdown et coordination motrice	-	<b>40 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 24 h)
Colin <i>et al</i> 1998 et 1999 / M32, M115, M232, M238	Non précisée	1 à 2 h	Effet knockdown	-	<b>1 ng/ab<sup>1</sup></b>
De courtye et Pham Délégué, 1998-1999 / M13, M32, M174, M232	Sol de la cagette contaminé à l'imidaclopride pendant toute la durée de l'expérience	13 jours	Seuil d'arrêt du REP Capacité d'apprentissage	<b>10 ng/ab<sup>1</sup></b>	-
Dresher, 1990 /M39	Pulvérisation sur l'abeille entière	24 à 72 h	Comportement de nettoyage et troubles respiratoires	-	<b>360 ppm</b>
Guez <i>et al.</i> , 2001 / A31	1 application imidaclopride sur le thorax	15, 60 min, 4h	REP abeilles de 4-7 jours Effet : habitude plus difficile	-	<b>0,1 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 15 mn et 4 h) <b>10 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 1 h)
			REP abeilles de 8-10 jours Effet : habitude plus facile	-	<b>0,1 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 15 mn et 1 h)
			Effet : habitude plus difficile	-	<b>1 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 4 h)
Thompson, 2000 /M218	1 application sur le thorax	4, 24 et 48 h	Effet knockdown et coordination motrice	-	<b>40 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 4 h)
Wilhelmy, 2000 /M217	1 application sur le thorax	4, 24 et 48 h	Effet knockdown et coordination motrice	-	<b>40 ng/ab<sup>1</sup></b> (après 24h)

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis. Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités connues<sup>1</sup> ou estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXIX).

## b) Critères de validation

Les critères d'évaluation que nous avons choisis pour baser notre évaluation des études menées en laboratoire sur les effets sublétaux reprennent, en partie, ceux proposés par l'OEPP (2001), *Organisation Européenne pour la Protection des Plantes*, et sont les suivants :

- N°1 : L'imidaclopride ou ces métabolites doivent être protégé de la lumière ou changé fréquemment (maximum toutes les 2 heures) afin d'éviter une photodégradation qui entrainerait un biais dans l'étude de la toxicité du produit testé.
- N°2 : Les quantités d'imidaclopride administrées aux abeilles, par voie orale ou par voie topique, sont mesurées dans l'étude et dans le cas où elles ne le sont pas, elles sont estimées par le calcul de la moyenne quotidienne de nectar consommé par abeille.
- N°3 : Les abeilles doivent être en bon état physiologique.
- N°4 : La fréquence et la durée du traitement sont précisées
- N°5 : Un minimum de 30 abeilles, regroupées en 3 lots séparés (3 cagettes de 10 abeilles) par traitement, est nécessaire et la mortalité du lot témoin doit être < 10%.
- N°6 : Le jeûne préalable des abeilles doit être compris entre 2 et 4 h.

Les abeilles peuvent provenir d'une même colonie ou non et être d'âges identiques ou non. Dans le cas d'abeilles de colonies ou d'âges différents, une variabilité plus importante pourra être observée.

## c) Résultats validés

Les résultats de l'évaluation des études sur les effets sublétaux testés en laboratoire sont synthétisés dans le Tableau XXIX.

**Tableau XXIX : Synthèse des résultats validés des effets sublétaux testés en laboratoire**

Résultats validés des effets sublétaux	Molécules testées (NOEC et LOEC exprimées en ng/abeille)					
	Imidaclopride	Oléfine	Di-Hydroxy-imidaclopride	5-Hydroxy-imidaclopride	Acide 6- chloro nicotinique	Dérivé urée
Coordination motrice et effet knockdown	NOEC <sup>1</sup> =0,94 à 9 LOEC <sup>1</sup> = 3,1 à 34,7 LOEC <sup>3</sup> =5 à 40				NOEC <sup>1</sup> =1,2 LOEC <sup>1</sup> =4,6	LOEC <sup>2</sup> =0,002 à 0.007 LOEC <sup>2</sup> =0,004 à 0.008
Réflexe d'extension du proboscis	NOEC <sup>1</sup> =1,25 à 3,5 LOEC <sup>1</sup> = 2,5 à 7 NOEC <sup>2</sup> =0,2 à 0,7 LOEC <sup>2</sup> =0,4 LOEC <sup>3</sup> =0,1à 10	NOEC <sup>1</sup> =2,5 à 7 LOEC <sup>1</sup> =12,5 à 35	NOEC <sup>1</sup> =2,5 à 7 LOEC <sup>1</sup> =5 à 14			
Perception olfactive	LOEC <sup>3</sup> =10					
Consommation de pollen	LOEC <sup>2</sup> =0,31 à 0,87					
Production de cire	LOEC <sup>2</sup> =0,31					
Reconnaissance entre apparentés	LOEC <sup>2</sup> =0,25 à 0,7					

<sup>1</sup> intoxication orale aiguë ; <sup>2</sup> intoxication orale chronique (10 à 12 jours) ; <sup>3</sup> intoxication topique aiguë

Les études qui remplissent les critères de validation cités dans le paragraphe 4.2.1 (partie b), ont pu être validées et à l'opposé, celles qui ne remplissaient pas ces critères n'ont pas pu être validées pour les raisons précises suivantes :

- Barth (M223, M227 et Thompson (M221, M226). Le taux de mortalité des abeilles de l'échantillon témoin est supérieur à 10%.
- Colin *et al.* (1998, 1999; M32, M233, M238, M115). Le jeûne préalable des abeilles est supérieur (17 h) à 4 h.
- Kling (2000, M222 ; M224). Dans la première étude (M222), le taux de mortalité des abeilles dans le lot témoin est supérieur (20%) à 10%. Dans la seconde étude (M224), aucune donnée n'est présentée. En l'absence de ces résultats, l'étude ne peut pas faire l'objet d'une évaluation.
- Pham-Délégué (2000, M33, parties I et II). Les abeilles d'hiver proviennent de colonies chauffées. Ces conditions expérimentales ne correspondent pas aux conditions naturelles dans lesquelles des abeilles d'hiver peuvent se retrouver. Pour les mêmes raisons, les études M13, M32 et M232 sont invalidées pour les essais sur les effets sublétaux à court terme dans le cas des intoxications orales aiguës.

-

#### d) Commentaires et perspectives

La variabilité des résultats des études précédemment analysées peut être due à l'utilisation de protocoles variés. Les différents protocoles utilisés sont synthétisés dans l'Annexe XXII, les renseignements demandés aux auteurs et les réponses correspondantes apparaissent dans l'Annexe XVIII et l'Annexe XIX. En effet, d'une étude à l'autre et à l'intérieur d'une même étude, les paramètres suivants peuvent être source de variabilité:

- Race des abeilles testées (*A. mellifera ligustica*, *carnica*, *mellifera*, *caucasica*, des hybrides et la lignée synthétique Buckfast).
- Âge et catégorie des abeilles testées (abeilles d'âge inconnu ou déterminé (de 4 à 42 jours), d'été ou d'hiver; abeilles nourrices ou butineuses).
- Degré d'hétérogénéité des colonies utilisées.
- Conditions d'élevage (rucher chauffé ou non)
- Quantité de sirop contaminé ingéré (de 10 µl à 33 µl / abeille / jour ou de 18 à 82 mg / abeille / jour) et de matière active déposée sur le thorax de l'abeille (de 1µl à 5 µl / abeille).
- Motivation des abeilles à consommer la nourriture (fonction de la durée du jeûne (de 1 h à 17 h) et de la concentration en sucre des sirops contaminés (20 % ou 50 %).
- Pertinence des observations (fonction de leur durée et fréquence. Pour les effets analysés sur le court terme, les observations ont généralement lieu 15, 30, 60 et 240 minutes après contact ou ingestion de l'imidaclopride. Pour les effets analysés sur le long terme, certaines observations ont lieu 24, 48, 72, 96 h ou 11 jours après administration de l'imidaclopride et d'autres toutes les 24 h pendant 2 à 13 jours d'administration de l'imidaclopride).

Il semble nécessaire de mettre en place de nouvelles directives officielles utilisant des protocoles standardisés pour l'étude des effets sublétaux des produits phytosanitaires sur les abeilles afin de pallier la variabilité des protocoles entraînant des études difficilement comparables.

#### 4.2.2 Etudes menées sous tunnels et en cages de vol

##### a) Résultats disponibles

###### \* Liste des études :

Au total, l'analyse des effets sublétaux sous tunnels porte sur 11 études :

- 1 étude menée en cage de vol (Kirchner 1999 et 2000; M12 partie II, M14 partie II ou M40) (cf. Tableau XXX).
- 4 études avec du sirop contaminé avec de l'imidaclopride et ses métabolites contenus dans des nourrisseurs (Colin *et al.* 1998, M115, M238 ; Colin et Bonmatin 2000, M3, M114, M193 ; Les et Pham-Delègue 1998 et 1999, M32, M174, M233) (cf. Tableau XXXI et Tableau XXXII).
- 3 études menées avec du pollen et du miel contaminés (Maus et Schöning 2001, M145 ; Schmuck et Schöning 1999, M15 et M146 ; Schmuck *et al.* 1999, M10, M11; 2001, A26) (cf. Tableau XXXIII).
- 3 études sur cultures de tournesol (Ambolet *et al.* 1997, M158 ; Schmuck *et al.* 1999, M10, M11 ; Tisseur 1998 et 1999, M32, M179, M232) traitées Gaucho. (cf. Tableau XXV).

###### \* Effets observés :

En plus des comportements précédemment décrits (cf. paragraphe 4.2.1), les auteurs des études sous tunnels se sont intéressés à observer **le comportement de butinage** (fréquentation des nourrisseurs et retour à la ruche) et **le comportement de reconnaissance d'une odeur**.

###### \* Résultats :

**Tableau XXX : Etudes en cages de vol des effets sublétaux de l'imidaclopride lors d'une exposition répétée (> à 10 jours) à une solution d'imidaclopride disposée dans un nourrisseur (intoxication chronique)**

Auteurs, année / Référence	Mode d'intoxication	Fréquence et durée d'observation	Effets observés	NOEC	LOEC
Kirchner, 1999 / M12 partie I Kirchner, 1998 et 2000 / M14, M84 partie I	Sirops 2 M avec imidaclopride / Sirop 0,5 M NaCl / sirop 2 M sans imidaclopride	4 fois 30 min X 2 h	Temps de recherche de la ruche	-	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100ppb)
		Non précisé X quelques heures à plusieurs mois (selon les facteurs étudiés)	Nombre de contacts trophallactiques	-	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100ppb)
			Danses tremblantes	-	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100ppb)

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les concentrations en ppb correspondent aux concentrations nominales de la solution contenant l'imidaclopride. Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXXV).

**Tableau XXXI : Etudes sous tunnels des effets sublétaux de l'imidaclopride lors d'une exposition répétée (4 jours à 4 semaines) à solution d'imidaclopride disposée dans un nourrisseur (intoxication chronique)**

Auteurs, année / Référence	Fréquence et durée du traitement	Effets observés	NOEC	LOEC
Colin <i>et al.</i> , 1998 / M32, M115, M238	2 h / jour X 4 jours	Fréquentation du nourrisseur	<b>0,63 à 1,75ng/ab<sup>2</sup></b> (25ppb)	<b>1,25 à 3,5 ng/ab<sup>2</sup></b> (50ppb)
		Quantité de sirop prélevée	-	<b>0,63 à 1,75ng/ab<sup>2</sup></b> (25ppb)
		Durée de la prise alimentaire	-	<b>0,15 à 0,42 ng/ab<sup>2</sup></b> (6ppb)
Colin et Bonmatin, 2000 / M3, M114, M193	2 h / jour X 5 jours	Fréquentation du nourrisseur	-	<b>0,075 à 0,21 ng/ab<sup>2</sup></b> (3ppb)
		Durée de la prise alimentaire	-	<b>0,075 à 0,21 ng/ab<sup>2</sup></b> (3ppb)
Decourtye et Pham-Delègue, 1998 / M32, M174, M233	1-2 h / jour X 4 semaines	Recrutement des butineuses	-	<b>0,25 à 0,7 ng/ab<sup>2</sup></b> (10ppb)
		Reconnaissance des odeurs	-	<b>0,25 à 0,7 ng/ab<sup>2</sup></b> (10ppb)
		Entrées-sorties de la ruche	-	<b>0,25 à 0,7 ng/ab<sup>2</sup></b> (10ppb)

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les concentrations en ppb correspondent aux concentrations nominales de la solution contenant l'imidaclopride. Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXXV).

**Tableau XXXII : Etudes sous tunnels des effets sublétaux des métabolites de l'imidaclopride lors d'une exposition répétée (5 jours) à une solution d'imidaclopride disposée dans un nourrisseur (intoxication chronique)**

Auteurs, année / Référence	Fréquence et durée du traitement	Effets observés	métabolites	NOEC	LOEC
Colin et Bonmatin, 2000 / M3, M114, M193	2 h / jour X 5 jours	Fréquentation du nourrisseur	Oléfine	-	<b>0,02 à 0,05 ng/ab<sup>2</sup></b> (0,75ppb)
			Monohydroxy-imidaclopride	<b>0,075 à 0,21 ng/ab<sup>2</sup></b> (3ppb)	-
		Durée de la prise alimentaire	Oléfine	-	<b>0,02 à 0,05 ng/ab<sup>2</sup></b> (0,75ppb)
			Monohydroxy-imidaclopride	-	<b>0,075 à 0,21 ng/ab<sup>2</sup></b> (3ppb)

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les concentrations en ppb correspondent aux concentrations nominales de la solution contenant l'imidaclopride. Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXXV).

**Tableau XXXIII : Etudes sous tunnels des effets sublétaux de l'imidaclopride sur les abeilles lors d'une exposition répétée à du pollen ou du miel contaminés (intoxication chronique)**

Auteurs, année / Référence	Mode d'intoxication	Fréquence d'observation et durée du traitement	Effets observés	NOEC	LOEC
Maus et Schöning, 2001 / M145	Pollen de maïs contaminé par un traitement à l'enrobage à l'imidaclopride	1 fois / j X 6 jours en 1 mois	Développement couvain et population	1 mg matière active /graine de maïs	-
			Production de cire, récolte de pollen et nectar		
			Poids de la ruche		
		Tous les 2 j X 24 j	Consommation pollen contaminé et miel Nombre d'abeilles sur les nourrisseurs de miel et pollen et sur le plafond du tunnel		
5 min / j X 24 j en 1 mois	Butinage Comportements anormaux				
Schmuck et Schöning, 1999 / M146	Pollen de maïs contaminé par pulvérisation à l'imidaclopride	7 fois en 1 mois	Développement du couvain et de la population	0,5 à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20ppb)	-
			Production de cire, récolte de pollen et nectar		
		8 fois en 1 mois	Poids de la ruche		
		1 fois / j X 34 j	Consommation de pollen contaminé et de miel		
		1 fois / j X 13 j (miel) et 5 j (pollen) en 1 mois	Nombre d'abeilles sur les nourrisseurs de miel et pollen		
		5 min / j X 24 j en 1 mois	Butinage Comportements anormaux		
Schmuck et Schöning, 1999 / M15 Schmuck <i>et al.</i> 2001 / A26	miel contaminé	5 min / jour X 39 jours	Butinage Collecte de pollen et de nectar Force de la colonie Etat du couvain	0,5 à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20ppb)	-

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les concentrations en ppb correspondent aux concentrations nominales de la solution contenant l'imidaclopride. Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XXXV).

**Tableau XXXIV : Etudes sous tunnels des effets sublétaux de l'imidaclopride sur les abeilles par intoxication sur du tournesol traité Gaucho**

Auteurs, année / Référence	Culture traitée / culture témoin	Fréquence et durée d'observation	Effets observés	Résultat
Ambolet <i>et al.</i> , 1997 / M158	Tournesol Gaucho N et N/2 / tournesol non Gaucho (+ un tunnel mixte de tournesol traité et non traité)	4 fois / j X 9 j sur 100 à 200 fleurs de tournesol	Activité de butinage	Traité < témoin (2 <sup>iers</sup> jours) Traités > témoin et N > N/2 (7 derniers jours)
			Intensité du butinage	Traité > témoin
Schmuck. <i>et al.</i> , 1999 / M10, M11	Tournesol Gaucho / tournesol non Gaucho	1 fois / j X 6 j	Intensité de butinage	Traité = témoin
			Mouvements désordonnés / apathie	Traité = témoin
		1 fois au début et en fin d'expérience	Développement population et réserves	Traité = témoin
		1 fois à la fin de l'expérience	Etat du couvain	Traité = témoin
Tisseur, ACTA 1998 / M32, M179, M232	Tournesol Gaucho ± fongicide / tournesol non Gaucho ± fongicide	2 fois / j X 7 j	Butinage	Traité = témoin

Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés.

Les résultats des études sur les effets sublétaux sous tunnels mettent en évidence, soit des différences significatives de comportement entre les lots d'abeilles traitées et les lots d'abeilles témoins, soit aucune différence de comportement.

Les études qui ont montré des différences significatives de comportement ont trouvé :

- Une diminution d'environ 15 abeilles à moins de 3 abeilles sur le nourrisseur au bout d'une heure de butinage, voire un arrêt de la fréquentation des nourrisseurs quand ceux-ci contiennent du sirop contaminé (Colin *et al.* 1998, M32, M115, M238).
- Une diminution, en quantité de sirop prélevé et en durée, de la prise alimentaire des abeilles qui consomment un sirop contaminé (Colin *et al.* 1998, M32, M115, M238).
- Une diminution de l'activité de butinage entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour d'observation (Ambolet *et al.* 1997, M158) et une augmentation à partir du 2<sup>e</sup> jour sur les cultures traitées.
- Une diminution du recrutement dans le lot d'abeilles traitées (Decourtye et Pham Délégué 1998, M32, M174, M233).
- Une affectation des capacités de reconnaissance d'une odeur dans le lot d'abeilles traitées (Decourtye et Pham Délégué 1998, M32, M174, M233).
- Une augmentation des danses tremblantes et du nombre de contacts trophallactiques dans le lot d'abeilles traitées (Kirchner 1999 et 2000; M12 partie II, M14 partie II ou M40).

## b) Les critères de validations

En plus du critère de validation N°1 retenu pour l'évaluation des études menées en laboratoire, nous avons déterminé les critères supplémentaires suivants :

- N°1 (protection de l'imidaclopride, cf. études en laboratoire)
- N°2 : Les cages de vol doivent être de grandes dimensions, c'est à dire au minimum de 2 x 2 x 3 m et les tunnels de 7 à 8 m de large, 17 à 20 m de long et 3 à 3,5 m de hauteur.
- N°3 : Les ruches expérimentales doivent être homogènes et présenter un développement suffisant (minimum de 3 cadres de couvain)
- N°4 : Les études qui s'intéressent à des paramètres liés à la colonie (activité, développement, couvain, récolte de miel, de nectar et de pollen, production de cire, etc.), doivent comporter des colonies d'un minimum de 4000 abeilles, compte tenu qu'une colonie en conditions naturelles est normalement composée d'environ 40 000 abeilles
- N°5 : Les études comportementales doivent comporter plusieurs séries d'observations qui doivent être d'une durée significative

## c) Résultats validés

Les résultats de l'évaluation des études sur les effets sublétaux testés sous tunnels sont synthétisés dans le Tableau XXXV. Les protocoles correspondants et les compléments d'informations demandés aux auteurs sont présentés respectivement en Annexes XXIII, XIX et XX.

**Tableau XXXV : Synthèse des résultats validés des effets sublétaux testés sous tunnels**

Résultats validés des effets sublétaux	Molécules testées (NOEC et LOEC exprimées en ng/abeille)		
	Imidaclopride	Oléfine	Hydroxy-imidaclopride
Effets observés			
Danses tremblantes	LOEC=2,5 à 7		
Temps de recherche de la ruche	LOEC=2,5 à 7		
Contacts trophallactiques	LOEC=2,5 à 7		
Fréquentation du nourrisseur	NOEC= 0,63 à 1,75 LOEC=0,075 à 3,5	LOEC=0,02 à 0,05	NOEC=0,075 à 0,21
Durée de la prise alimentaire	LOEC=0,07 à 0,425	LOEC=0,02 à 0,05	LOEC=0,075 à 0,21
Quantité de sirop prélevé	LOEC=0,63 à 1,75		
Recrutement des butineuses	LOEC=0,25 à 0,7		
Reconnaissance des odeurs	LOEC=0,25 à 0,7		
Entrées-sorties de la ruche	LOEC=0,25 à 0,7		

Les études qui remplissent les critères de validation cités dans le paragraphe 3.2.1 (partie b), ont pu être validées et à l'opposé, celles qui ne remplissaient pas ces critères n'ont pas pu être validées pour les raisons précises suivantes :

- Maus et Schöning (2001). Les micro colonies sont composées d'un nombre d'abeilles inférieur à quelques milliers (n = 700 abeilles / colonie). Le comportement des abeilles n'a été observé que 5 minutes par jour.
- Schmuck *et al.* (1999, M10 et M11). Les micro colonies sont composées d'un nombre d'abeilles inférieur à quelques milliers (n = 500 abeilles / colonie).
- Schmuck et Schöning (1999, M15) et Schmuck *et al.* (2001, A26). Ces études ont fait l'objet d'une analyse d'évaluation approfondie présentée en Annexe XXV. De plus, il existe une ambiguïté sur la manière dont les nourrisseurs ont été protégés de la lumière (*sheltered container* n'implique pas que les nourrisseurs soient ambrés). Compte tenu que les nourrisseurs ne sont changés que tous les 3 jours, si ceux-ci sont inadéquatement protégés de la lumière il y a un risque de photodégradation de l'imidaclopride, les effets observés seront alors dus aux métabolites qui peuvent ou non être toxiques.
- Schmuck et Schöning (1999, M146) Les micro-colonies sont composées d'un nombre d'abeilles inférieur à quelques milliers (n = 500 abeilles / colonie). De plus, il existe une ambiguïté sur la manière dont les nourrisseurs ont été protégés de la lumière (cf ci-dessus). Compte tenu que les nourrisseurs ne sont changés que tous les 7 à 13 jours, si ceux-ci sont inadéquatement protégés de la lumière il y a un risque de photodégradation de l'imidaclopride.

#### d) Commentaires et perspectives

Les études sous tunnels et sur cultures présentent des possibilités intéressantes pour analyser les effets des cultures traitées sur l'activité de butinage. Cependant, l'activité de butinage ne devrait pas se limiter à un dénombrement d'abeilles sur capitules (qui peut présenter de nombreux biais) mais à une analyse fine et qualitative du comportement individuel de chaque abeille qui butine sur plusieurs fleurons. Par ailleurs, les études sous tunnels utilisant du sirop contaminé ne distinguent pas les abeilles qui consomment le sirop, des abeilles qui ne le consomment que partiellement ou pas du tout et qui ne font que le transporter dans leur jabot, surtout si les abeilles présentes au nourrisseur ne sont pas identifiées et marquées. Pour de telles études, les réponses observées peuvent donc être très variables, en fonction du niveau de consommation de sirop par les abeilles. De même, les études utilisant du sirop, du pollen et du miel contaminés posent le problème de la dégradation éventuelle de l'imidaclopride par la lumière au cours du temps dans ces types d'aliments, surtout quand les nourrisseurs ne sont pas renouvelés fréquemment. Le dosage de l'imidaclopride dans ces aliments devrait être réalisé avant et après expérience.

Etudes menées en plein champ :

#### a) Résultats disponibles

##### \* Liste des études :

L'analyse des effets sublétaux en plein champ porte sur 11 études :

- 4 études menées avec du sirop contaminé contenu dans des nourrisseurs (Belzunces *et al.* 1998, M32, M244 ; Belzunces et Suchail 2001, M53 partie I a ; Kirchner 1999, M12; 2000 M14, M84 partie I) (cf. Tableau XXXVI et Tableau XXXVII).

6 études menées avec des cultures de tournesol traité Gaucho (Ambolet *et al.* 1997, M158 ; Fléché 1998, M32, M166, M232 ; Schulz 1999, M16 ; Stadler 2000, M142 ; Szentes 1999, M141 ; Tisseur 1998, M32, M170, M232) (cf Tableau XXXVIII)

- 1 étude menée avec des cultures de colza traité Gaucho (Scott-Dupree et Spivack 2000, M143) (cf. Tableau XXXIX).

\* **Effets observés :**

En plus des comportements précédemment décrits (cf. paragraphes 4.2.1 et 4.2.2), les auteurs des études sur les effets sublétaux en plein champ se sont intéressés à observer **l'activité et le comportement de butinage des abeilles directement** sur les capitules.

\* **Résultats**

**Tableau XXXVI : Etudes en plein champs des effets sublétaux engendrés par une exposition à une solution d'imidaclopride disposée dans un nourrisseur**

Auteurs année / Référence	Traité/ témoin	Fréquence d'observation X durée d'expérience	Effets observés	NOEC	LOEC
Belzunces et Suchail, 1998 et 2001 / M53 partie 1a	Sirop 50 % avec imidaclopride / Sirop 50 % sans imidaclopride	6 h / j X 5 j	Fréquentation nourrisseur	<b>2,5 à 7 ng/ab<sup>2</sup> (100 ppb)</b>	<b>25 à 70 ng/ab<sup>2</sup> (1000 ppb)</b>
			Tremblements, immobilité sur le nourrisseur	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	25 à 70 ng/ab <sup>2</sup> (1000 ppb)
Belzunces <i>et al.</i> 1998 / M32, M244	Sirop 50 % avec imidaclopride / Sirop 50 % sans imidaclopride	4 h / j X 10 j à 11 j	Retour au nourrisseur	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	25 à 70 ng/ab <sup>2</sup> (1000 ppb)
			tremblements du corps, envol difficile et immobilisme lors du butinage	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	25 à 70 ng/ab <sup>2</sup> (1000 ppb)
Kirchner, 1999 / M12 partie I Kirchner, 1998 et 2000 / M14, M84 partie I	Sirops 2 M avec imidaclopride / sirop 2 M sans imidaclopride	4 fois 30 min X 2 h	Présence au nourrisseur	<u>0,5</u> à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20 ppb)	2,5 à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)
		2h/jour X 10jours max pour une cohorte (selon les facteurs étudiés)	Danses frétilantes	<u>0,25</u> à 0,7 ng/ab <sup>2</sup> (10ppb)	0,5 à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20 ppb)
			Danses tremblantes	<u>0,25</u> à 0,7 ng/ab <sup>2</sup> (10ppb)	0,5 à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20 ppb)
			Précision distance	<u>0,5</u> à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20 ppb)	2,5 à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)
Précision angle	<u>0,25</u> à 0,7 ng/ab <sup>2</sup> (10ppb)	0,5 à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20 ppb)			

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les parties **en blanc** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XL).

**Tableau XXXVII : Etudes en plein champs des effets sublétaux engendrés par une exposition à une solution d'oléfine disposée dans un nourrisseur**

Auteurs année / Référence	Traité / témoin	Fréquence d'observation X durée d'expérience	Effets observés	NOEC	LOEC
Kirchner, 1999 / <b>M12</b> partie I Kirchner, 1998 et 2000 / <b>M14, M84</b> partie I	Sirop 2 M avec oléfine / sirop 2 M sans oléfine	4 fois 30 min X 2 h	Présence au nourrisseur	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	-
		2h/jour X 10jours max pour une cohorte (selon les facteurs étudiés)	Danses frétilantes	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	-
			Danses tremblantes	<u>0,25</u> à 0,7 ng/ab <sup>2</sup> (10ppb)	0,5 à 1,4 ng/ab <sup>2</sup> (20 ppb)
			Précision distance	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	-
			Précision angle	<u>2,5</u> à 7 ng/ab <sup>2</sup> (100 ppb)	-

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées<sup>2</sup> de liquide qu'une abeille ingère. Les **parties blanches** correspondent aux résultats validés et les résultats soulignés correspondent aux valeurs les plus faibles enregistrées et validées pour chaque comportement observé (cf. Tableau XL).

**Tableau XXXVIII : Etudes en plein champ des effets sublétaux engendrés par du tournesol traité Gaucho**

Auteurs, Année / Référence	Culture traitée / culture témoin	Fréquence d'observation X durée d'expérience	Effets observés	Effet / témoin
Ambolet <i>et al.</i> , 1997 / M158	Tournesol Gaucho N et N/2 / tournesol non Gaucho	Séquences d'observation de 1 minute, 1 fois / j sur 100 capitules X 7 j	Butinage	Traité > témoin (1 <sup>er</sup> jour) Traité = témoin (6 derniers jours)
		1 min / j X 7 j	activité à la ruche (entrées des abeilles)	Traité > témoin
		1 fois / j X 6 j	Poids des ruches	Traité > témoin
Fléché CNEVA, 1998 / M32, M166, M232	Tournesol Gaucho / tournesol non Gaucho + Lindane	1 fois / j X 10-12 j	Activité de butinage	Traité = témoin
		1 fois / j X 16 j	Activité à la ruche / compteurs	
		1 fois / j X 9 j	Développement de la population	
		1 fois / j X 5 j	Développement du couvain	
		1 fois / j X 20 j	Développement des réserves + miel	
	1 fois / j X 39 j	Récoltes de pollen		
Schulz, 1999 / M16	Tournesol Gaucho / tournesol non Gaucho	Non précisé	Récolte de miel Butinage	Traité < témoin Traité = témoin
Stadler, 2000 / M142	Tournesol Gaucho + endosulfan / tournesol non Gaucho + endosulfan	1 fois / j X 5 j	Développement du couvain et de la population	Traité = témoin
		1 fois / j X 7 j	Quantité de miel stocké	Traité = témoin
		1 fois / j X 5 j	Récolte pollen/nectar sur cadres	Traité = témoin
		100 fleurs / j X 9 j	Nombre d'abeilles sur fleur	Traité > témoin
		3 min / j X 10 j	Abeilles avec pelotes de pollen entrantes à la ruche	Traité = témoin
Szentes <i>et al.</i> , 1999 / M141	Tournesol Gaucho / tournesol non Gaucho	1 fois / j X 13 j	Récolte pollen sur fleur	Traité > témoin
		1 minute / j X 13 j	Récolte pollen à la ruche	Traité = témoin
		2 fois en 15 j	Quantité de miel stocké	Traité < témoin
		2 fois en 15 jours	Développement du couvain -cellules vides -cellules avec couvain	Traité < témoin Traité > témoin
		1 fois en 15 jours	Renouvellement de reines	3 sur site traité
Tisseur ACTA, 1998 / M32, M179, M170	Tournesol Gaucho / tournesol non Gaucho (Indre), tournesol non Gaucho + Carbofuran (Vendée Marais) et tournesol fipronil + Lindane (Vendée Plaine)	2 fois / jour X 10 jours	Activité de butinage	Traité = témoin
		-2 min / j X 13 j -15 min / j X 24 j	Activité à la ruche - Estimation visuelle - Estimation / compteurs	
		- 1 fois / j X 4 j - 1 fois / j X 4 j - 1 fois / j X 13 j	Développement de la ruche : - population - couvain - réserves	
		1 fois / j X 24 j	Récoltes de pollen	

Les **parties blanches** correspondent aux résultats validés. N : traitement à la dose de 0,7 mg m.a. / graine et N/2 : traitement à la dose de 0,35 mg m.a. / graine. Les **parties blanches** correspondent aux résultats validés

**Tableau XXXIX : Etudes en plein champ des effets sublétaux engendrés par du Colza Gaucho**

Auteurs, Année / Référence	Culture traitée / culture témoin	Fréquence d'observation X durée d'expérience	Effets observés	Effet / témoin
Scott-Dupree et Spivak, 2000 / M143	Colza Gaucho / colza non Gaucho	2 fois : au début et à la fin de l'expérience	Développement du couvain et de la population	Traité = témoin
		1 fois / semaine X 1 mois	Quantité de miel stocké	Traité = témoin
		1 min / j X 4 j	Récolte pollen/nectar sur fleur	Traité = témoin
		2 min / j X 12 j	Comportements anormaux	Traité = témoin

Les parties blanches correspondent aux résultats validés

Les résultats des études sur les effets sublétaux en plein champ mettent en évidence, soit des différences significatives de comportement entre les lots d'abeilles exploitant des cultures traitées et les lots d'abeilles exploitant des cultures témoins, soit aucune différence de comportement.

Les études qui ont montré des différences significatives de comportement ont trouvé :

- Des tremblements et des difficultés d'envol sur le nourrisseur. Des symptômes anormaux sur les sites traités et témoin, mais en nombre plus élevé sur site traité. Immobilité et chutes importantes des abeilles sur la planche de vol (Belzunces et al 1998 et 2001, M53 partie I a ; Belzunces *et al.* 1998, M32, M244).
- Un nombre d'abeilles actives supérieur sur le site traité que sur le site témoin (Ambolet *et al.* 1997, M158 ; Stadler 2000, M142). Ces auteurs ont trouvé 21 et 31 abeilles / 100 capitules sur site traité contre 7 et 17 abeilles / 100 capitules sur site témoin. Une diminution du nombre d'abeilles sur le nourrisseur contaminé entre 20 et 100 ppb (Kirchner 1998, 1999 et 2000, M12, M14 ou M84).
- Une activité de butinage au champ furtive et une exploitation des fleurons anormale (irrationnelle et immobilisation sur capitule). La fréquence des visites au nourrisseur, placé à 500 m de la ruche, diminue de 4 vols /30 min à 0,8 vols/30 min au bout de 2 heures d'observation (Kirchner 1998, 1999 et 2000, M12, M14 ou M84). Dans certains cas, la récolte du pollen sur fleur est supérieure dans le champ traité que dans le champ témoin (Szentes *et al.* 1999, M141).
- Un développement du couvain supérieur dans le champ traité par rapport au champ témoin (Szentes *et al.* 1999, M141).
- Une production de miel dans les champs témoins supérieure à celle obtenue dans les champs traités (Szentes *et al.* 199, M141). Dans d'autres cas, l'inverse a été observé (Ambolet *et al.* 1997, M158).
- Une diminution en nombre et en précision des danses frétilantes (qui stimulent le butinage) et une augmentation des danses tremblantes (qui inhibent le butinage) (Kirchner 1998, 1999 et 2000, M12, M14 ou M84).

- Une diminution de l'acuité (mesurée à 1° près) de l'estimation des distances (Kirchner 1998, 1999 et 2000, M12, M14 ou M84).
- Une augmentation du temps de recherche de la ruche et du nombre de contacts trophallactiques (t-test,  $p < 0,01$ ) (Kirchner 1998, 1999 et 2000, M12, M14 ou M84).
- Une augmentation de la production de miel pendant l'expérience, supérieure pour les colonies placées sur le site témoin que pour celles placées sur le site traité (Schulz, 1999, M16)

#### b) Critères de validations

Les études menées en plein champ sur les effets sublétaux sont validées lorsque le protocole de ces études répond aux critères suivants :

- N°1 : Les champs doivent être suffisamment grands pour que les abeilles n'exploitent pas d'autres cultures (une abeille exploite en moyenne 6,3 Km<sup>2</sup>). Les champs témoins et traités doivent être bien séparés et la distance doit être connue.
- N°2 : Les colonies doivent être équilibrées (environ 10-12 cadres dont 5-6 de couvain), saines, normales, bien nourries, comprendre plus de 4000 abeilles et placées dans les champs quelques jours avant l'essai.
- N°3 : Un minimum de 3 colonies / traitement est nécessaire.
- N°4 : Les études comportementales doivent comporter plusieurs séries d'observations qui doivent être régulières, comparables et d'une durée significative.
- N°5 : Les parcelles traitées et témoin doivent être dans des conditions de production nectarifère comparable (floraison, microclimat, sol variété, etc.).

#### c) Résultats validés

Les résultats de l'évaluation des études sur les effets sublétaux testés sous tunnels sont synthétisés dans le Tableau XL. Les protocoles d'études, les compléments d'informations demandés aux auteurs et leurs réponses sont présentés respectivement en Annexe XXIV; XIX et XX.

**Tableau XL : Synthèse des résultats validés des effets sublétaux engendrés par une exposition à une solution d'imidaclopride disposée sur nourrisseur en plein champs**

Résultats validés des effets sublétaux	Molécules testées (NOEC et LOEC exprimées en ng/abeille)	
	Imidaclopride	Oléfine
Danses tremblantes	NOEC=0,25 à 0,7 LOEC= 0,5 à 1,4	NOEC=0,25 à 0,7 LOEC= 0,5 à 1,4
Danses frétilantes	NOEC=0,25 à 0,7 LOEC= 0,5 à 1,4	NOEC=2,5 à 7
Précision de la distance	NOEC=0,5 à 1,4 LOEC=2,5 à 7	NOEC=2,5 à 7
Précision de l'angle	NOEC=0,25 à 0,7 LOEC= 0,5 à 1,4	NOEC=2,5 à 7
Retour au nourrisseur	NOEC=2,5 à 7 LOEC= 25 à 70	
Fréquentation du nourrisseur	NOEC=0,5 à 7 LOEC=2,5 à 70	NOEC=2,5 à 7
Coordination motrice	NOEC=2,5 à 7 LOEC = 25 à 70	

Les études qui remplissent les critères de validation cités dans le paragraphe 3.2.1 (partie b), ont pu être validées et à l'opposé, celles qui ne remplissaient pas ces critères n'ont pas été validées pour les raisons précises suivantes :

- Szentes (1999, M141) : la concentration d'imidaclopride utilisée dans cette étude est supérieure à la dose homologuée (2 mg / graine au lieu de 1 mg / graine). Le champ témoin est entouré de champs de maïs et de tournesol (à 2 Km et 1,4 Km, respectivement). Les abeilles peuvent exploiter ces zones. D'ailleurs, les auteurs remarquent la présence d'autres abeilles que celles testées dans les parcelles expérimentales de plusieurs dizaines d'hectares (*strange bees and bees from a strange apiary*).

Suite à notre demande de complément d'information (cf. Annexe XIX), l'auteur nous a précisé le type de traitements effectué dans ces zones pendant la période d'expérimentation mais ne nous a pas fourni d'information concernant d'éventuels traitements Gaucho (au semis des cultures, c'est à dire bien avant le démarrage de l'expérience) (cf. Annexe XX).

Etant donné que l'on ne peut pas exclure la visite de ces champs par les abeilles du champ témoin et étant donné que l'on ne connaît pas le traitement au semis des champs avoisinants, on ne peut pas conclure sur la validité du site témoin. La même critique vaut pour le champ traité qui est également entouré de champs de maïs dont on ne connaît pas le traitement au semis.

- Ambolet *et al.* (1997, M158) : l'activité de butinage n'a pas été mesurée au même stade de floraison dans les champs traité et témoin ce qui conduit à un biais (la floraison dans le champ témoin est plus tardive et l'activité de butinage y est donc moins importante que dans le champ traité).

- Fléché (1998, M32, M166, cité dans M232) : le protocole de l'étude est imprécis. Aucune information n'est donnée sur l'historique du traitement des sites. Le site traité Gaucho contient des pucerons sur les boutons floraux, ce qui remet en question la validité du site traité comme tel. Par ailleurs, les pollens provenant du champ témoin contiennent de l'imidaclopride (entre 8 et 14 ppb), ce qui remet en question la validité du site témoin comme tel.

- Schulz (1999, M16) : à notre demande de complément d'information sur le protocole et les résultats de cette étude (Annexe XIX) l'auteur nous a fourni une note explicative (Annexe XX). La description des sites testés est incomplète (distance qui sépare le site témoin du site traité inconnue, types culturaux et traitements conduits dans les champs avoisinants non définis). On ne peut donc pas exclure la visite d'autres champs (traités ou non) que ceux testés par les abeilles. D'ailleurs, les auteurs remarquent que les colonies placées sur les sites témoin vont en partie exploiter ailleurs et de façon inégale selon le site (*bees at the control sites were sampling more pollen from other plants than bees at the Gaucho site*). Par conséquent la faible activité de butinage sur le site témoin par rapport au site traité n'est pas forcément une conséquence du facteur traitement Gaucho. En effet, sur le site témoin, les abeilles préfèrent exploiter d'autres cultures (*analyses of honeysacs of bees from the control site revealed a preference for flowering oil redish and California bluebell...*), d'où une faible activité sur ce site. Enfin, l'activité de butinage est mesurée chez les abeilles et les bourdons réunis sans distinction d'activité entre ces 2 groupes.

- Scott-Dupree et Spivack (2000, M143) : l'étude porte sur des observations faites en plein champs. Les observations comportementales sont effectuées sur des intervalles de temps de seulement 2 minutes un jour sur deux (*for 2 minutes intervals every other day*, page 7). Cette durée est insuffisante et le manque de régularité dans la fréquence des observations est

insatisfaisant. La superficie des champs traités et témoins (0,1 Km<sup>2</sup> / site) est trop faible et par conséquent le risque que les abeilles testées butinent à l'extérieur de ces sites est très grand. Ne connaissant pas le type de cultures avoisinantes (témoin ou traitées), on ne peut pas comparer convenablement les sites entre eux.

- Stadler (2000, M142) : cette étude présente un problème majeur qui est la présence d'imidaclopride dans la parcelle expérimentale témoin, bien que la quantité d'imidaclopride contenue dans ce sol ne puisse pas être déterminée (< LQ et LQ = 5 ppb, page 31).

- Tisseur (1998, M32, M170, cité dans M232) : cette étude (effectuée sur 3 régions) comporte de nombreuses insuffisances. Le compteur d'abeilles utilisé dans l'étude sur le site Indre décèle des déficits d'abeilles. Sur le site Vendée Marais, des quantités notables de pollen de maïs sont retrouvées dans les trappes (ces cultures sont situées à plus de 3 Km de la parcelle expérimentale). Le site témoin en Vendée Plaine a été traité Régent. Enfin, compte tenu de la rémanence de l'imidaclopride dans le sol et compte tenu que les sols de tous les sites (Vendée Plaine, Vendée Marais et Indre) ont été traités au Gaucho à l'année n - 2, on ne peut pas exclure la présence de cette molécule dans les champs témoins. D'ailleurs, l'analyse de la teneur en imidaclopride dans ces sols démontre qu'il y a des quantités détectées (< LQ et LQ = 8 ppb, LD non déterminée, M232, annexes pages 1, 5, 8 et 13).

#### d) Commentaires et Perspectives

On regrettera qu'aucune étude en champs avec une intoxication sur tournesol ou maïs traités Gaucho n'ait été validée. Néanmoins, les études en plein champ posent le problème majeur de la difficulté d'observer avec assurance des abeilles qui s'alimentent uniquement sur la source testée (témoin ou traitée). Elles posent aussi le problème de la difficulté de maîtriser les conditions expérimentales (floraison, production nectarifère, ...) qui ne sont jamais identiques entre parcelles (témoins et traitées).

Les études en plein champs menées sur des nourrisseurs contaminés sont un bon compromis entre les conditions sous tunnels et de plein champ, dans la mesure où les abeilles qui s'alimentent sur la source contaminée sont marquées et distinguées des abeilles qui vont butiner ailleurs. Cependant, il faut souligner que pour ce type d'étude, il existe de nombreuses incertitudes, en particulier en ce qui concerne l'activité de butinage de l'abeille en dehors des périodes d'observation.

Conclusions des études sur les effets sublétaux :

Les études menées en laboratoire, sous tunnels et en plein champ sur les effets sublétaux de l'imidaclopride et de ses résidus sur les abeilles souffrent de grandes insuffisances sur le plan méthodologique.

Nombreuses sont les études qui ne présentent pas rigoureusement les résultats obtenus : les représentations graphiques sont pauvres, les résultats bruts manquent, les tests utilisés et les résultats statistiques ne sont pas décrits.

Rares sont les études qui suivent les directives fournies pour les tests menés en laboratoire, sous tunnels et en plein champ. Les protocoles de ces études sont donc souvent incomplets et les résultats qui en découlent sont difficilement exploitables.

**Il semble également important de souligner qu'un effet sublétaux peut devenir, à terme létaux. En effet lorsqu'une butineuse est affectée de trouble de mémoire, d'orientation ou de troubles physiologiques affectant les systèmes respiratoires ou circulatoires, elle peut ne pas regagner sa ruche. Elle mourra alors rapidement de faim ou de froid. L'effet sublétaux, n'est donc dans ce cas, qu'apparent.**

### 4.3 Récapitulatif et Recommandations concernant les Données de Toxicité de l'imidaclopride et de ces métabolites

#### 4.3.1 Intoxication aiguë (1 seule administration)

\* **Rappel des critères de validation**

Lignes directrices de l'OCDE 213 (intoxication orale) 214 (intoxication topique)

\* **Intoxication par voie orale**

**Imidaclopride :**

Nombre d'études 10

Etudes invalidées : 0

Résultats validés : DL50 : de **4 à 71 ng** d'imidaclopride /abeille

**Métabolites**

Nombre d'études : 4

Etudes invalidées : 0

Résultats validés : DL50 de **28 à >35,7 ng d'oléfine** /abeille

DL50 de **153 à 258 ng d'hydroxy imidaclopride** /abeille

DL50 **>1000 ng autres métabolites** /abeille

\* **Intoxication par voie topique**

**Imidaclopride :**

Nombre d'études 8

Etudes invalidées : 0

Résultats validés : DL50 : de **6,7 à 242,6 ng** d'imidaclopride /abeille

#### 4.3.2 Intoxication Chronique

\* **Rappel des critères de validation**

-N°1 : Conditions de maintenance des abeilles : obscurité, enceinte climatisée à 25°C±2°C et 50 à 70% d'humidité relative.

-N°2 : Indication de l'âge, la race d'abeille, date d'expérimentation et méthode de collecte.

-N°3 : 10 abeilles minimum par cage, 3 cages minimum par doses testées, le test doit être répété 3 fois, 1 groupe témoins et au minimum 3 concentrations différentes testées. Durée du test : 10 jours

-N°4 Enregistrement de la mortalité toutes les 24 ou 48 h. Mortalité des témoins inférieure à 15% au bout de 10 jours.

\* **Intoxication suite à l'administration réitérée d'imidaclopride par voie orale (intoxication chronique)**

Nombre d'études 5

Etudes invalidées : 2

Références	Motifs d'invalidations (non respect du critère N°)
M13, M32, M162, M165 : Decourtye et al, 1998 ; Inra de Bures	Résultats non fiables d'après les auteurs, problème de concentrations des solutions
M33 : « études d'hiver », Decourtye et al, 2000 ; Inra de Bures	1

## Etudes et Résultats validées : 2

Références	Résultats
M47 : Suchail, 2001 ; Inra d'Avignon	<b>DL50 = 0,1 ppb (12pg/ab pendant 10jours)</b>
M33 : « études d'été » Decourtye et al, 2000 ; Inra de Bures	<b>NOEC = 48 ppb, LOEC = 96 ppb (NOEC= 16000 pg/ab ; LOEC = 32000pg/ab)</b>

Etude non évaluée: 1

\* **Intoxication suite à l'administration réitérée des métabolites de l'imidaclopride par voie orale (intoxication chronique)**

Nombre d'études 13

Etudes invalidées : 9

Métabolites testés	Références	Motifs d'invalidations (non respect du critère N°)
Hydroxy-imidaclopride Oléfine	M33, M259, M191 ; Etudes d'hiver, Decourtye et al, 2000 ; Inra de Bures	1
Dérivé urée Acide 6 chloronicotinique	M221, M226 ; Thompson, 2000	4
	M222, M230 : « Foraging bees, Kling 2000	
	M223, M227 : "Field bees", Barth, 2000	
	M225, M229 : "Foraging bees et field bees" Wilhelmy, 2000	

Etudes validées :

Métabolites testés	Références	Résultats
Hydroxy-imidaclopride Oléfine Di hydroxyimidaclopride Dérivé Guanidine Acide 6 chloronicotinique Dérivée urée	M47, Suchail, 2001 ; Inra d'Avignon	<b>DL50 = 0,1 ppb (12pg/ab pendant 10jours)</b>
Dérivé urée Acide 6 chloronicotinique	M224, M231 : « Hive bees, Kling 2000	<b>NOEC&gt;10 ppb (2740Pg/ab pendant 10 jours)</b>
	M223, M227 : "House bees", Barth, 2000	
	M228: Worker Bees; Bruhnke, 2000	

#### 4.3.3 Effets sublétaux

\* **Etudes en laboratoire, intoxication par administration réitérée**

Rappel des critères de validation :

-N°1 : Protection de l'imidaclopride de la lumière.

-N°2 : Indication de la quantité d'imidaclopride administrées aux abeilles.

-N°3 : Bon état physiologiques des abeilles.

- N°4 : 30 abeilles minimum en 3 lots. Durée du test : 10 jours.
- N°5 : Mortalité des témoins inférieure à 15% au bout de 10 jours.
- N°6 : jeune préalable entre 2 et 4 heures.

Nombre d'études : 33

Etudes invalidées : 10

Etudes non validées	
Références	Critères d'invalidation
Barth (2000, M223 et M227 seulement pour les abeilles butineuses) <sup>2</sup>	N°5 (mortalité > 40%)
Colin <i>et al.</i> (1998, M32, M115, M233, M238 seulement pour les essais sur la quantité de sirop ingérée et l'effet knockdown en oral et topique) <sup>1,3</sup>	N°6 (jeûne de 17h)
Kling (2000, M222) <sup>2</sup>	N°5 (mortalité > 20%)
Pham-Délègue et Tableau XXXIV (2000, M33 parties I et II, études d'hiver seulement) <sup>2</sup>	Rucher chauffé en hiver
Thompson (2000, M221, M226) <sup>2</sup>	N°5 (mortalité > 15%)
DeCourtaye et Pham délègue (1998, M13, M32, M174) <sup>1,2,3</sup>	Rucher chauffé et problème de concentration

Etudes validées : 22

Etudes validées	
Références	Critères de non évaluation
Armengaud <i>et al.</i> (2002, A36) <sup>3</sup>	
Barth (2000, M220 <sup>1,3</sup> , M223 <sup>2</sup> , M227 <sup>2</sup> seulement pour les abeilles d'intérieur)	
Bruhnke (2000, M228) <sup>2</sup>	
Belzunces et Suchail (2001, M53 partie I-4) <sup>3</sup>	
Colin <i>et al.</i> (1998, M32, M115, M233, M238) <sup>3</sup>	
Dresher (1990, M39) <sup>3</sup>	
Guez <i>et al.</i> (2001; A31) <sup>3</sup>	
Kirchner (1999 et 2000, M12 partie II et M14 partie II ou M40) <sup>1,2</sup>	
Pham-Délègue et Tableau XXXIV (2000, M33 parties I et II, études d'été seulement) <sup>2</sup>	
Schmitzer (1992, M135 et 1999, M6) <sup>1</sup>	
Schmuck et Schöning (1999, M9) <sup>1</sup>	
Thompson (2000, M218, M219) <sup>3</sup>	
Wilhelmy (2000, M217 <sup>1</sup> , M225 <sup>2</sup> seulement pour les abeilles d'intérieur et M229 <sup>2</sup> )	
Etudes non évaluées	
Références	Critères de non évaluation
Kling (2000, M224) <sup>2</sup>	N°5 (pas de données)

<sup>1</sup> intoxication aiguë par voie orale; <sup>2</sup> intoxication chronique (10 à 12 jours) par voie orale ; <sup>3</sup> intoxication par voie topique

## Synthèse des principaux résultats validés:

Résultats validés des effets sublétaux	Molécules testées (NOEC et LOEC exprimées en ng/abeille)					
	Imidaclopride	Oléfine	2-Hydroxy-imidaclopride	5-Hydroxy-imidaclopride	Acide 6-chloro nicotinique	Dérivé urée
Coordination motrice et effet knockdown	NOEC <sup>1</sup> =0,94 LOEC <sup>3</sup> =5			NOEC <sup>1</sup> =1,2	LOEC <sup>2</sup> =0,002	LOEC <sup>2</sup> =0,004
Réflexe d'extension du proboscis	NOEC <sup>1</sup> =1,25 NOEC <sup>2</sup> =0,2 LOEC <sup>3</sup> =0,1	NOEC <sup>1</sup> =2,5	NOEC <sup>1</sup> =2,5			
Perception olfactive	LOEC <sup>3</sup> =10					
Consommation de pollen	LOEC <sup>2</sup> =0,31					
Production de cire	LOEC <sup>2</sup> =0,31					
Reconnaissance entre apparentés	LOEC <sup>2</sup> =0,25					

<sup>1</sup> intoxication aiguë par voie orale; <sup>2</sup> intoxication chronique (10 à 12 jours) par voie orale ; <sup>3</sup> intoxication par voie topique

\* **Etudes en cage de vol et sous tunnels, intoxication par administration répétée**

Rappel des critères de validation :

- N°1 : Protection de l'imidaclopride de la lumière.
- N°2 : Dimensions correctes des cages de vols.
- N°3 : Homogénéité des ruches et développement suffisant du couvain .
- N°4 : 4000 abeilles minimum lorsque l'étude porte sur une activité de la colonie.
- N°5 : Durée significative de l'observation.

Nombre d'études : 11

Etudes invalidées : 5

Etudes non validées	
Références	Critères d'invalidation
Maus et Schöning (2001, M145)	N°4 (n=700 ab), N°5 (5 min/j)
Schmuck <i>et al.</i> (1999, M10 et M11)	N°4 (n=500 ab)
Schmuck et Schöning (1999, M15)	N°4 (n=500 ab), N°1* (N changé tous les 3 jours) + voir annexe XV
Schmuck <i>et al.</i> (2001, A26)	N°4 (n=500 ab), N°1* (N changé tous les 3 jours) + voir + annexe XV
Schmuck et Schöning (1999, M146)	N°5 (n=500 ab), N°1* (N changé tous les 7 à 13 jours)

Etudes validées : 6

Etudes validées
<b>Références</b>
Ambolet <i>et al.</i> (1997, M158)
Colin et Cl (2000, M3, M114, M193)
Colin <i>et al.</i> (2000, M32, M115, M238)
Decourtye et Pham-Délègue (1998, M32, M174)
Kirchner (1999 et 2000; M12 partie II, M14 partie II ou M40)
Tisseur (1998, M32, M179, M232)

N = nourrisseur; \* *Sheltered container* = *nourrisseurs abrités* (ambiguïté sur la manière dont les nourrisseurs ont été protégés de la lumière)

Synthèse des principaux résultats validés

Résultats validés des effets sublétaux	Molécules testées (NOEC et LOEC exprimées en ng/abeille)		
	Imidaclopride	Oléfine	Hydroxy-imidaclopride
Danses tremblantes	LOEC=2,5		
Temps de recherche de la ruche	LOEC=2,5		
Contacts trophallactiques	LOEC=2,5		
Fréquentation du nourrisseur	LOEC=0,075	LOEC=0,02	NOEC=0,075
Durée de la prise alimentaire	LOEC=0,075	LOEC=0,02	LOEC=0,075
Quantité de sirop prélevé	LOEC=0,63		

\* **Etudes en plein champ**

Critères de validations :

- N°1 : Superficie des champs importante, séparation suffisante des champs traités et témoins. Protection de l'imidaclopride de la lumière.
- N°2 : 4000 abeilles minimum en bon état physiologique, placées dans le champs quelques jours avant l'expérience
- N°3 : 3 colonies/traitement minimum
- N°4 : Durée significative de l'observation
- N°5 : champs traités et témoins dans les mêmes conditions nectarifères

Nombre d'études : 11

Etudes invalidées : 7

Etudes non validées	
Références	Critères d'invalidation
Ambolet <i>et al.</i> (1997, M158)	N°5 (floraison)
Szentes (1999, M141)	N°1
Fléché (1998, M32, M166, M232)	Site témoin non valide
Schulz (1999, M16)	N°1
Scott-Dupree et Spivack (2000, M143)	N°1 et N°4
Stadler (2000, M142)	Site témoin non valide
Tisseur (1998, M32, M170, M232)	Site témoin non valide

Etudes validées : 3

Etudes validées	
Références	
Belzunces <i>et al.</i> (1998, M32, M244)	
Belzunces et Suchail (2001, M53 partie Ia)	
Kirchner (1999, M12 partie I ; 2000, M14, M84 partie I)	

Synthèse des principaux résultats validés

Résultats validés des effets sublétaux	Molécules testées (NOEC et LOEC exprimées en ng/abeille)	
	Imidaclopride	Oléfine
Effets observés		
Danses tremblantes	NOEC=0,25	NOEC=0,25
Danses frétilantes	NOEC=0,25	NOEC=2,5
Précision de la distance	NOEC=0,5	NOEC=2,5
Précision de l'angle	NOEC=0,25	NOEC=2,5
Retour au nourrisseur	NOEC=2,5	
Fréquentation du nourrisseur	NOEC=0,5	NOEC=2,5
Coordination motrice	NOEC=2,5	

## DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES RISQUES

L'évaluation des risques pour les abeilles liés à l'utilisation de l'imidaclopride en enrobage de semences peut être réalisée selon l'approche classique d'évaluation des risques, à savoir : la comparaison entre le niveau d'exposition et les dangers liés à la molécule.

Actuellement diverses méthodologies reposant toutes sur l'approche classique présentée ci dessus sont décrites dans différents textes réglementaires.

La première méthodologie est celle développée en support à la directive européenne 67/548 dans le guide technique d'évaluation des risques liés aux substances chimiques nouvelles et existantes ou *Technical Guidance Document*<sup>10</sup>. La seconde correspond à la méthodologie d'évaluation des risques liés à l'utilisation des produits phytosanitaires développée en appui à la directive européenne 91/414 (directive 96/12, correspondant aux annexes II et III de la directive 91/414).

Dans les deux cas, l'évaluation des risques consiste à comparer une concentration prédite d'exposition, communément appelée "PEC" (*Predicted Environmental Concentration*) à une concentration prévue sans effet pour les organismes de l'environnement, la "PNEC" (*Predicted No Effect Concentration*). Un risque est alors mis en évidence lorsque le rapport PEC/PNEC est supérieur à 1.

Dans le cas de l'évaluation des risques pour les abeilles liés à l'utilisation des produits phytosanitaires (directive 91/414), l'approche développée, bien que reposant sur les mêmes concepts d'exposition et d'effet est légèrement différente de l'approche « substances chimiques ». En effet, dans ce cas, seul est évalué en première approche un quotient de risque correspondant au rapport entre la dose d'emploi au champ (en mg/ha) et la DL50 aiguë de contact ou orale. Dans le cas de produits d'enrobage de semences, la notion de dose à l'hectare n'a pas de sens réel et la méthode de détermination du quotient de risque ne s'applique donc pas.

**C'est pourquoi, l'évaluation des risques pour les abeilles liés à l'enrobage de semences sera réalisée selon la procédure « substances chimiques nouvelles et existantes », procédure ayant fait l'objet d'un consensus au niveau de l'union européenne.**

La PEC est la dose à laquelle sera exposée l'abeille, soit par exemple la dose ingérée par voie orale par l'abeille en absorbant miel, nectar et pollen. Dans le calcul d'évaluation de risques, cette valeur sera estimée à l'aide des scénarios d'exposition développés dans la partie 6.1. La méthodologie de détermination des PNEC sera développée dans la partie 5.1

## 5 EVALUATION DES EFFETS

### 5.1 Méthodologie

**Dans le cas des substances chimiques nouvelles et existantes**, les dangers sont abordés au travers d'une concentration prévisible sans effet pour les écosystèmes, c'est-à-dire pour l'ensemble des espèces des écosystèmes terrestres ou aquatiques. Cette valeur est habituellement obtenue en appliquant un facteur d'incertitude aux données issues d'essais réalisés en laboratoire, selon les principes énoncés dans le *Technical Guidance Document* relatif à l'évaluation des risques des produits chimiques. Le calcul de la PNEC consiste à diviser la plus basse des L(E)C<sub>50</sub> (Lethal (efficient) Concentration<sub>50</sub>) ou NOEC (No Observed Effect Concentration) par un facteur d'incertitude. Ces facteurs ont été établis pour représenter les incertitudes suivantes :

---

<sup>10</sup> Technical Guidance documents in support of the Commission Directive 96/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances, publié au J.O.C.E, 19/4/1996.

- la variation intra- et inter-laboratoires des données de toxicité, la variation intra- et inter-spécifiques,
- l'extrapolation des données de toxicité court terme au long terme,
- l'extrapolation du laboratoire au plein champ.

La valeur du facteur d'incertitude dépend de la nature et du nombre de données disponibles. Ainsi ce facteur diminuera lorsque des données seront disponibles sur des organismes représentant plusieurs niveaux trophiques, plusieurs groupes taxonomiques ou lorsque des données de toxicité chronique seront disponibles.

Afin d'illustrer ce propos, les facteurs d'incertitude habituellement utilisés pour déterminer la PNEC pour l'environnement terrestre sont rapportés à titre indicatif dans le Tableau XLI

**Tableau XLI: Facteurs d'incertitude pour le calcul d'une PNEC<sub>terrestre</sub> (d'après le Technical Guidance Document)**

Information disponible	Facteur d'incertitude
Concentration létale 50% obtenue lors de tests de toxicité aiguë (par ex. plantes, vers de terre, ou micro-organismes)	1000
Concentration sans effet (NOEC) obtenue lors d'un essai de toxicité chronique (par ex. plantes)	100
Concentration sans effet (NOEC) obtenue lors d'essais de toxicité chronique sur deux espèces représentant 2 niveaux trophiques	50
Concentration sans effet (NOEC) obtenue lors d'essais de toxicité chronique sur trois espèces représentant 3 niveaux trophiques	10
Données en plein champ	Cas par cas

Les facteurs d'incertitude proposés dans le tableau ci dessus ont pour objet l'évaluation d'une PNEC pour l'ensemble de l'écosystème. Dans le cas présent, l'objectif est l'évaluation d'une PNEC pour un groupe taxonomique donné, la détermination des facteurs d'incertitude sera donc adaptée de ce tableau en respectant la gradation proposée.

La valeur de la PNEC sera évaluée à partir, soit des données de toxicité aiguë (1 seule administration d'imidaclopride) dont nous disposons, soit des données de toxicité chronique (administration répétée), soit des données de toxicité sublétales (suite à une ou plusieurs administrations d'imidaclopride) en leur associant un facteur d'incertitude. A chaque nouvelle donnée permettant de réduire l'extrapolation (exemple données de toxicité chronique par rapport aux données de toxicité aiguë), ce facteur d'incertitude sera réduit (généralement d'un facteur 10).

Bien que l'on évalue couramment les risques encourus par les abeilles lors de la mise sur le marché de différents produits phytosanitaires appliqués aux parties aériennes des cultures, la méthodologie d'évaluation utilisée dans ce rapport est originale et sans précédent. En effet, elle repose sur :

- des mesures de concentration de la substance active dans différents substrats récoltés ou non par les abeilles, mesures habituellement non disponibles pour un pesticide classique
- le développement de scénarios d'exposition à la substance active en accord avec les connaissances actuelles sur les abeilles.

- l'utilisation de facteurs de risques traditionnellement utilisés dans l'évaluation de risques de toxiques en prenant en compte la concordance entre la situation expérimentale et la situation de terrain.

Compte tenu de son originalité, cette approche n'a pas été validée au plan international sur l'abeille et est susceptible d'être affinée si de nouvelles connaissances devaient être intégrées.

Compte tenu de la spécificité de l'évaluation réalisée, c'est à dire détermination d'une PNEC pour les abeilles et non d'une PNEC pour l'ensemble de l'écosystème les facteurs d'incertitude tout en s'inspirant de ceux présentés dans le TGD seront déterminés au cas par cas.

## 5.2 Evaluation des effets à partir de données de toxicité aiguë suite à 1 seule administration d'imidaclopride

### \* Intoxication par voie orale

La concentration prévisible sans effet de l'imidaclopride pour les abeilles est évaluée sur la base des données de toxicité aiguë orale. La DL50 48h de l'imidaclopride est comprise entre 4 et 71 ng/abeille (voir paragraphe 4.1.1). La valeur la plus basse de cet intervalle sera utilisée pour le calcul de la concentration prévisible sans effet.

Conformément au Tableau XLI, le facteur d'incertitude devrait être de 1000. Toutefois, la toxicité aiguë de l'imidaclopride ayant été évaluée dans de nombreux essais aux résultats convergents (différents laboratoires, différentes races), et l'évaluation ne concernant qu'un seul groupe taxonomique, l'incertitude existante sur ces données diminue, il nous semble donc possible de ramener le facteur d'incertitude de 1000 à 100.

$$\text{PNEC} = 4/100 = 0,04 \text{ ng} = 40 \text{ pg/ab}$$

### \* Intoxication par voie topique

La DL50 de l'imidaclopride par voie topique se situe entre 6,7 et 243 ng par abeille. Le même raisonnement que celui appliqué à l'intoxication orale aiguë est valable ici. La PNEC sera donc basée sur la plus faible valeur de l'intervalle de toxicité et les mêmes facteurs d'incertitude seront utilisés.

Le facteur de 100 conduit à une valeur de PNEC de :

$$\text{PNEC} = 6,7 / 100 = 0,067 \text{ ng} = 67 \text{ pg/ab}$$

## 5.3 Evaluation des effets à partir de données de toxicité chronique suite à l'administration réitérée d'imidaclopride par voie orale

La concentration prévisible sans effet est évaluée sur la base des données de toxicité chronique validées dans le paragraphe 4.1.2 :

- DL 50 10 jours = 0,012 ng / ab dans les études d'Avignon (Suchail, 2001, M47)
- NOEC 11 jours = 17 ng/abeille dans les études de Bures-sur-Yvette (Decourtye, 2000, M33)

Théoriquement, le calcul de la PNEC est basé sur la plus basse des valeurs obtenues. Un rapport de 1000 est observé entre la DL50 de Suchail et la NOEC de l'étude de Decourtye. Cependant les protocoles d'études de ces 2 auteurs sont très différents (cf. Annexe XX), notamment en ce qui concerne le prélèvement des abeilles et leurs âges. Compte tenu de ces différences de protocoles, les deux études ne sont pas comparables et nous obligent à prendre en compte ces 2 résultats.

Classiquement la PNEC pour l'ensemble de l'écosystème est dérivée de la DL50 d'un essai de toxicité aiguë par application d'un facteur d'incertitude de 1000. Dans le cas présent, s'agissant d'une DL50 pour un essai long terme, il nous paraît possible d'utiliser le même facteur d'incertitude (100) que celui appliqué à une NOEC pour un essai long terme. Ce facteur d'incertitude est utilisé pour déterminer une PNEC pour l'ensemble des groupes taxonomiques de l'écosystème. Si comme c'est le cas ici il s'agit de déterminer une PNEC pour un groupe taxonomique donné il nous paraît judicieux de s'affranchir d'un facteur 10 sur le facteur d'incertitude, facteur permettant de couvrir les variations entre groupes taxonomiques faisant ainsi passer le facteur d'incertitude de 100 à 10.

L'application de ce facteur d'incertitude de 10 conduit à la PNEC suivante :

$$PNEC_{\text{Suchail}} = 0.012/10 = 0,0012 \text{ ng} = 1,2 \text{ pg/abeille}$$

En ce qui concerne les larves, nous ne disposons d'aucune donnée validée de toxicité et ne pouvons donc déterminer de PNEC.

#### 5.4 Evaluation des effets à partir des études de toxicité sublétales

La concentration prévisible sans effet est évaluée à partir des données concernant les trois types d'études disponibles : les études en laboratoire, les études en tunnel et les études en plein champ.

##### 5.4.1 Etudes en laboratoire

###### a) Intoxication suite à 1 seule administration d'imidaclopride par voie orale

Selon les résultats des différentes études présentées dans le paragraphe 4.2.1, Tableau XXIX, et selon le type d'effet étudié (effet "knockdown, effet sur la coordination motrice, effet sur le réflexe d'extension du proboscis, effet sur la prise alimentaire), la NOEC se situe entre 0,94 ng/ab (Wilhemy, 2000, M217) et 9 ng/ab (Barth, 2000, M220).

Le calcul de la PNEC se fait sur la base de la plus basse valeur de cet intervalle. S'agissant de données d'intoxication orale sur du court terme, un facteur de 100 devrait être utilisé. Néanmoins, le calcul étant basé sur une dose sans effet (et non sur une dose entraînant 50 % d'effet) et l'effet mesuré étant un effet sublétales, un facteur de 50 semble utilisable dans une première évaluation.

$$PNEC = 0,94 / 50 = 0,02 \text{ ng} = 20 \text{ pg/ab}$$

###### b) Intoxication suite à une administration répétée d'imidaclopride par voie orale

Selon les études réalisées et présentées dans le paragraphe 3.2.1., Tableau XXIX, les résultats sont exprimés sous forme de NOEC ou de LOEC. En cas d'absence de NOEC pour une étude, le calcul de la concentration prévue sans effet se base sur une LOEC.

Selon le type d'étude réalisé et le type d'effet mesuré, les données de toxicité se situent entre 0,2 ng/ab (NOEC correspondant à un effet sur le conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis, Decourtye et Pham Délégué, 2000, M33, études d'été) et 0,87 ng/ab (LOEC sur la consommation de pollen et production de cire, Colin, 1998, M32, M115, M233 et M238) pour des abeilles adultes. Le réflexe d'extension du proboscis permet d'étudier les capacités d'apprentissage olfactif de l'abeille et de mettre en évidence les éventuelles perturbations des fonctions sensorielles et intégratives sur lesquelles reposent la perception de signaux environnementaux et les processus d'apprentissage. Si cette procédure est classiquement utilisée pour étudier le comportement de butinage, la perception des signaux environnementaux est également importante pour les abeilles d'intérieur. De ce fait, les déficits cognitifs mis en évidence par le REP peuvent affecter les butineuses et les abeilles d'intérieur.

Le calcul de la PNEC pour les abeilles adultes (butineuses et abeilles d'intérieur) se base donc sur la plus faible valeur de cet intervalle avec un facteur d'incertitude de 10, approprié car le calcul est basé

sur une concentration sans effet et qu'il s'agit d'une intoxication chronique et de la mesure d'un effet subléthal.

$$PNEC = 0,20 / 10 = 0,020 \text{ ng} = 20 \text{ pg/ab}$$

c) Intoxication suite à 1 seule administration d'imidaclopride par voie topique

La concentration prévisible sans effet est évaluée sur la base des NOEC, ou à des défaut des LOEC des études validées présentées dans le Tableau XXIX du chapitre 3.2.1. Les résultats d'essais étant exprimés en fonction de la persistance de l'effet en fonction du temps, les résultats correspondant aux effets persistant le plus longtemps possible sont conservés pour l'évaluation des risques. A titre d'exemple, si une LOEC est mesurée après 15 min et 30 min, la LOEC après 30 min est utilisée pour l'évaluation des risques car elle est plus représentative de la récupération naturelle possible des abeilles dans l'environnement après un stress.

Les données de toxicité se situent donc entre 0,1 ng/ab (LOEC après 4 heures sur le REP des abeilles de 4-7 jours de l'étude de Guez, 2001, A31) et 40 ng/ab (LOEC sur l'effet knockdown et de coordination motrice après 4 heures de l'étude de Thomson, 2000, M 218 ou après 24 heures des études de Barth, 2000, M220 et Wihelmy, 2000, M217).

Le calcul de la PNEC est donc basé sur la plus basse valeur de l'intervalle, et par analogie avec l'intoxication par voie orale aiguë, le facteur d'incertitude utilisé sera de 50.

$$PNEC = 0,1 / 50 = 0,002 \text{ ng} = 2 \text{ pg/ab}$$

#### 5.4.2 Etudes menées sous tunnel

Les résultats des différentes études, présentés dans le Tableau XXXV, ont conduit à des valeurs de LOEC comprises entre 0,075 ng/ab (effet sur la fréquentation du nourrisseur et la durée de la prise alimentaire de l'étude de Colin, 2000, M3, M114 et M193) et 7 ng/ab (effets sur les danses tremblantes, sur le temps de recherche de la ruche et sur les contacts trophallactiques des études de Kirchner, 1998, 1999 et 2000, M12, M14, M84).

La concentration prévisible sans effet est évaluée à partir de la plus basse des valeurs de l'intervalle de LOEC en prenant en considération un facteur d'incertitude de 10, approprié pour ces études dont la représentativité est grande, les conditions d'exposition des abeilles butineuses se rapprochant des conditions naturelles.

$$PNEC = 0,075 / 10 = 0,0075 \text{ ng} = 7,5 \text{ pg/ab}$$

#### 5.4.3 Etudes en plein champ

Les résultats des différentes études, présentés dans le Tableau XL, ont conduit à des valeurs de NOEC comprises entre 0,25 ng/ab (NOEC sur les danses tremblantes, sur les danses frétilantes et sur la précision de l'angle dans les études Kirchner, 1998, 1999 et 2000, M12, M14 et M94) et 7 ng/ab (NOEC des études de Belzunces, 1998 et 2001, M32, M53 et M244).

Pour les abeilles butineuses de nectar, les études en plein champ devraient être les plus représentatives des conditions environnementales. Cependant, ces études ont été menées sur nourrisseurs et ne correspondent donc pas totalement aux conditions d'exposition réelles des butineuses dans l'environnement. Par précaution, un facteur d'incertitude de 5 est appliqué à la plus basse des NOEC.

$$PNEC = 0,25 / 5 = 0,05 \text{ ng} = 50 \text{ pg/ab}$$

## 5.4.4 Récapitulatif sur le calcul des PNEC

**Tableau XLII : Tableau récapitulatif du calcul des PNEC par intoxication orale à l'imidaclopride**

		Variable observée	Facteur d'incertitude	PNEC
<b>Toxicité aiguë</b>				
DL50 48h = 4 ng/ab		Mortalité	100	40 pg/ab
<b>Toxicité chronique par voie orale</b>				
Abeilles adultes : DL50 10j = 0,012 ng/ab		Mortalité	10	1,2 pg/ab
<b>Toxicité subléthale</b>				
<i>Laboratoire</i>	<b>1 seul traitement par voie orale</b> NOEC = 0,94 ng/ab	Modifications comportementales	50	20 pg/ab
	<b>traitement réitéré par voie orale</b> NOEC = 0,2 ng/ab	Modifications comportementales	10	20 pg/ab
<i>Sous tunnel</i>	Sur nourrisseur LOEC = 0,075 ng/ab	Modifications comportementales	10	7,5 pg/ab
<i>Plein champ</i>	Sur nourrisseur NOEC = 0,25 ng/ab	Modifications comportementales	5	50 pg/ab

**Tableau XLIII : Tableau récapitulatif du calcul des PNEC par intoxication topique à l'imidaclopride**

		Variable observée	Facteur d'incertitude	PNEC
<b>Toxicité aiguë</b>				
DL50 = 6,7 ng/ab		Mortalité	100	67 pg/ab
<b>Toxicité subléthale</b>				
<i>Laboratoire</i>	<b>1 seul traitement par voie topique</b> LOEC = 0,1 ng/ab	Modifications comportementales	50	2 pg/ab

**6 EVALUATION DE L'EXPOSITION**

La quantité d'imidaclopride susceptible d'entrer dans une colonie est très variable et dépend des types et de la surface des cultures traitées présentes dans son environnement, ainsi que des choix de butinage des ouvrières quant au pollen et/ou nectar récoltés.

**6.1 Le calcul des concentrations prédites d'exposition (PEC)**

Plusieurs modes d'intoxication des abeilles sont envisageables, en fonction de :

- la nourriture récoltée (pollen et / ou nectar) et utilisée (pollen, nectar et / ou miel) par les abeilles,
- la catégorie d'abeille qui manipule et utilise cette nourriture : les larves, les abeilles d'intérieur de moins de 3 semaines (nourrices par exemple) et les abeilles d'extérieur de plus de 3 semaines (butineuses),
- la saison (printemps, été, automne et hiver).

Nous avons donc établi une série d'hypothèses et élaboré plusieurs scénarios d'intoxication.

Remarque : compte tenu des propriétés peu lipophiles de l'imidaclopride, son accumulation dans les cires n'est pas attendue mais ne peut être exclue (Stadler, 2000, M142).

## 6.2 Cas du pollen

Le pollen ramené à la ruche par les butineuses est stocké pour une utilisation soit immédiate soit différé. Les conséquences d'un empoisonnement de ce pollen pourraient donc ne se faire sentir qu'au bout de quelques semaines à quelques mois, par exemple à la sortie de l'hivernage.

Ne disposant pas à ce jour de données sur l'éventuelle stabilité chimique de l'imidaclopride dans le pollen stocké, la première évaluation de risque supposera le composé stable.

Nous disposons des quantités d'imidaclopride dosées dans les pollens de fleurs (tournesol et maïs) et dans les pollens de trappe.

Les données concernant le pollen de trappes sont difficilement utilisables pour deux raisons :

- la pose de trappes à pollen entraîne une perturbation de l'activité de la colonie qui met en œuvre des mécanismes compensatoires afin de combler les pertes de pollens dues à la trappe. Actuellement les trappes à pollen présentent des rendements de 20 à 40%. Du fait de ces mécanismes compensatoires, le pollen de trappe et à fortiori les dosages d'imidaclopride dans le pollen de trappe, ne représentent pas, d'un point de vue quantitatif, ce qui rentre dans la ruche.

- Par ailleurs, le pollen récolté dans les trappes peut être d'origines florales diverses et de ce fait être plus ou moins contaminé à l'imidaclopride.

Compte tenu de ces biais que peuvent entraîner la prise en compte des dosages d'imidaclopride dans les pollens de trappes, notre évaluation de l'exposition se basera uniquement sur les résultats des dosages dans le pollen de fleurs.

Il n'en reste pas moins que les trappes gardent leur intérêt pour apprécier le pollen dont dispose les abeilles sur un plan qualitatif.

### Scénario 1 : Nutrition des larves

Les larves sont nourries par les nourrices d'un mélange de pollen, miel et sécrétions des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires appelé « pain d'abeilles ». Les larves consomment du pollen principalement aux 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours de leur vie.. Les données disponibles de la littérature estiment à 42 mg la quantité d'aliments ingérés par la larve pendant 5 jours (Haydak, 1968, A171). L'examen du tube digestif d'une larve d'abeille montre qu'elle consomme en moyenne 1,7 mg de pollen de maïs, cette consommation ne couvrant que 5% de ces besoins (Babendreier, communication personnelle). La consommation de pollen de maïs et de tournesol peut donc être considérée comme négligeable en regard de la quantité totale d'aliments ingérés par la larve. La composition en sucres dans la bouillie larvaire varie en fonction de l'âge de la larve, de 18% (ouvrière de moins de 4 jours) et 44% (ouvrière de plus de 4 jours). En considérant que ce sucre provient exclusivement du miel de réserve stocké pendant l'hivers et sachant que le miel est obtenu par évaporation de 60% d'eau du nectar, on peut estimer que le sucre proviendra de la transformation de 3 mg de nectar pour les larves de moins de 4 jours et de 46 mg de nectar pour les larves de plus de 4 jours. Le niveau d'intoxication de la larve sera donc fonction de son âge et du pourcentage de contamination du nectar de tournesol qu'elle ingère (Tableau XLIV).

**Tableau XLIV : Quantités théoriques d'imidaclopride absorbées par les larves de moins et de plus de 4 jours qui consomment respectivement 3 et 46 mg de nectar de tournesol ou équivalent contaminé**

**Concentration d'imidaclopride contenu dans le nectar de tournesol = 1,9 (µg/kg ou ppb)**

		Quantité d'imidaclopride absorbée (pg)	
		Ouvrière <4jours(3 mg)	Ouvrière >4 jours (46 mg)
Pourcentage de nectar de tournesol contaminé à l'imidaclopride	100%	5,7	87
	80%	4,5	70
	60%	3,4	52
	40%	2,3	35
	20%	1,1	17

### Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices

Les abeilles âgées de 1 à 10 jours, ont besoin de pollen pour le développement de leurs glandes hypopharyngiennes et de leurs corps adipeux (Maurizio 1954, A156). Une jeune ouvrière adulte consomme environ 60 mg de pollen au total pendant les 10 premiers jours de sa vie (Pain and Maugenet, 1966, A81). Si le pollen consommé est contaminé, l'abeille risque de s'intoxiquer. Sur cette base, et sur la base des teneurs en imidaclopride dans les pollens de fleurs et de panicules, les quantités d'imidaclopride consommées par ces abeilles ont été estimées en considérant un régime correspondant à un mélange comportant du pollen contaminé et du pollen non contaminé en différentes proportions (20, 40, 60 et 80 et 100%). A noter que l'hypothèse de 100 % s'applique dans le cas où l'ouvrière ne consomme que du pollen contaminé ; ce qui est probablement assez rare sur le territoire national. C'est pourquoi, en s'inspirant des proportions de pollens de tournesol et de maïs récoltés dans les trappes (cf paragraphe 3.4.1), nous nous baserons sur des pourcentages de contamination de 90 et 80% pour les pollens de tournesol et de maïs respectivement

#### a) Calcul de la PEC en cas d'intoxication par du pollen de tournesol

Les dosages d'imidaclopride dans le pollen de fleurs de tournesol ont conduit à des teneurs de 3,3-3,4 ppb (moyenne = 3,35ppb) (Stork, 1999, M5).

Le calcul des quantités d'imidaclopride absorbées par les nourrices qui consomment du pollen de tournesol pendant 10 jours est présenté dans le Tableau XLV.

**Tableau XLV : Quantités théoriques d'imidaclopride absorbées par les nourrices qui consomment pendant 10 jours du pollen de tournesol contaminé (60 mg) dans la ruche**

Concentration d'imidaclopride contenu dans le pollen de fleurs de tournesol = 3,35 (µg/kg ou ppb)		
Pourcentage de pollen de tournesol contaminé par l'imidaclopride		Quantité d'imidaclopride absorbée par les abeilles au bout de 10 jours de consommation (pg)
		90%
80 %	161	
60 %	121	
40 %	80	
20 %	40	

#### b) Calcul de la PEC en cas d'intoxication par du pollen de maïs

Les dosages d'imidaclopride dans le pollen de panicules de maïs ont conduit à des teneurs de 3,28-3,65 ppb (moyenne = 3,5ppb) (Bonmatin et al, 2002, M210).

Le calcul des quantités d'imidaclopride absorbées par les nourrices qui consomment du pollen de panicules de maïs pendant 10 jours est présenté dans le Tableau XLVI

**Tableau XLVI : Quantités théoriques d'imidaclopride absorbées par les nourrices qui consomment pendant 10 jours du pollen de maïs (60 mg) contaminé dans la ruche**

Concentration d'imidaclopride contenu dans le pollen de panicule = 3,5 (µg/kg ou ppb)	
Pourcentage de pollen de maïs contaminé par l'imidaclopride	Quantité d'imidaclopride absorbée par les abeilles au bout de 10 jours de consommation (pg)
80 %	168
60 %	126
40 %	84
20 %	42

Nous soulignons que dans certains cas, les pollens de maïs et de tournesol peuvent coexister au sein d'une même ruche.

Par ailleurs, ce scénario ne prend en compte que la consommation de pollen par les nourrices qui consomment également du miel afin de faire face aux dépenses énergétiques liées à leurs activités. Le quantité de contaminant entrant est donc ici sous estimée. Cette consommation de miel est traitée dans le scénario 5.

### Scénario 3 : les butineuses de pollen

Les butineuses peuvent se spécialiser dans la récolte d'un seul type de nourriture (pollen ou nectar) ou au contraire récolter les deux types à la fois (nectar et pollen). La proportion de butineuses spécialisées dans la récolte de nectar (58%) est nettement supérieure à la proportion de butineuses spécialisées dans la récolte de pollen (25%) ou des deux types (17%) (Parker 1926, A160 ; Free 1960, A151). Néanmoins, quelle que soit leur spécialité de butinage, les butineuses consomment toutes des produits de la ruche (nectar et/ou miel) afin de stocker l'énergie nécessaire à la réalisation de leur tâche, elles pourront alors s'intoxiquer suivant le scénario 4.

Lorsque les abeilles butineuses récoltent du pollen et / ou du nectar de tournesol, elles se recouvrent le corps de grandes quantités de pollen contribuant ainsi à la pollinisation du tournesol (Parker 1981).

Ce phénomène a également été observé et bien décrit sur maïs « *La langue et les mandibules lèchent et mordent les anthères ce qui a pour résultat de faire adhérer les grains de pollen aux pièces buccales et de les humecter de nectar et de salive. Ainsi une grande partie du pollen est délogée des anthères et adhère aux poils des pattes et du corps. Les poils ramifiés de l'abeille sont favorables à la retenue du pollen sec et poudreux* » (Louveaux 1958, A155).

Les butineuses qui récoltent du pollen et/ou du nectar peuvent donc s'intoxiquer par voie topique et/ou orale en effectuant leur activité de butinage et lors de la confection des pelotes. La butineuse spécialisée dans la récolte du nectar de tournesol peut également s'intoxiquer par voie topique avec le pollen déposé sur ses poils.

Dans le cas d'une intoxication topique, les données de la littérature définissent la quantité de pollen transportée sur les poils et sur les pattes de l'abeille. Une étude a dénombré une moyenne de 1780 grains de pollen de tournesol transporté sur les poils de l'abeille (Parker, 1981, A160) mais le poids d'un grain de pollen n'est pas connu, ce qui ne nous permet pas de déterminer la quantité totale de pollen en contact avec les abeilles. D'autre part, une abeille transporte, par voyage, entre 10 à 30 mg de pollen sous forme de pelotes (Winston, 1987, A85). Nous n'avons cependant aucune indication concernant la biodisponibilité de l'imidaclopride dans une pelote de pollen et sa diffusion à travers la

cuticule de l'abeille. Dans la mesure où l'imidaclopride est dosé dans le pollen de trappe et la substance active est enfermée dans le grain de pollen, sa biodisponibilité nous semble limitée voire nulle. C'est pourquoi nous n'envisagerons pas d'intoxication par voie topique

En ce qui concerne une intoxication de type oral, la littérature scientifique réunie sur ce sujet n'a pas permis de déterminer la quantité de pollen qui serait ingérée par l'abeille lors de la confection des pelotes. Cette ingestion paraît négligeable, nous l'estimons arbitrairement à 1% de la quantité de pollen récolté (0,1 à 0,3 mg). Une abeille effectue en moyenne 10 à 15 voyages par jour pour la récolte de pollen (pour revue, Winston, 1990), la quantité totale de pollen ingérée sera alors comprise entre 1 et 4,5 mg.

Enfin, les abeilles mélangeant rarement les origines florales de pollen lors de la confection de pelotes (Free 1963, A149), on peut considérer que l'abeille qui récolte du pollen de tournesol ou maïs traité ingérera un pollen contaminé à 100%.

#### a) Cas du pollen de tournesol

Les dosages d'imidaclopride dans le pollen de fleurs de tournesol ont conduit à des teneurs de 3,3-3,4 ppb (moyenne=3,35 ppb) (Stork, 1999, M5).

La quantité d'imidaclopride (PEC) à laquelle est exposée une abeille qui ingère 1 à 4,5 mg de pollen contaminé à 100% se situe donc entre 3,3 et 15 pg.

#### b) Cas du pollen de maïs

Les dosages d'imidaclopride (PEC) dans le pollen de panicules de maïs ont conduit à des teneurs de 3,28-3,65 ppb (moyenne = 3,5 ppb)(Cl, 2002, M210).

La quantité d'imidaclopride à laquelle est exposée une abeille qui ingère 1 à 4,5 mg de pollen sous forme de pelote se situe donc entre 3,5 et 16 pg.

### 6.3 Cas du nectar et du miel

Les butineuses qui récoltent le nectar à proximité de la colonie ne consomment généralement pas ce nectar ou seulement une faible part. Elles le rapportent à la ruche et le distribuent à des abeilles "magasinières" qui vont le déposer dans les cellules. Une partie de ce nectar peut être consommée immédiatement par les ouvrières présentes dans la ruche ou ultérieurement, sous forme de nectar ou de miel.

En revanche, lorsque la source de nectar est éloignée de la ruche, la butineuse a besoin, pour les vols allers et/ou retour, de consommer une partie du miel et/ou nectar qu'elle récolte, ce qui pourrait induire des conséquences néfastes, différentes en fonction de la quantité absorbée. Ces paramètres ne sont naturellement pas maîtrisés par les expérimentateurs.

Il existe donc deux principaux types de scénarios « nectar et miel » où les abeilles risquent une intoxication.

#### Scénario 4 : les butineuses de nectar de tournesol

Avant de partir sur sa zone de butinage, l'abeille accumule de l'énergie en consommant du nectar ou du miel stocké dans la colonie (Brandstetter *et al.* 1998, A145). Si le nectar consommé est contaminé, l'abeille risque de s'intoxiquer. Le taux de contamination du nectar dépendra du paysage cultural environnant la ruche (présence ou non de champs de tournesol traité ou non Gaucho).

Si la zone du butinage est éloignée, l'abeille peut consommer une partie du nectar qu'elle vient de récolter pour son vol retour.

Pendant son vol, la butineuse consomme une partie du nectar qu'elle vient de butiner pour couvrir ses dépenses énergétiques de vol, soit 11,5 mg de sucres par heure de vol (Olaert, 1956, A80, Heinrich, 1979, A79). Une fraction de ce nectar (5 à 17%) provient de l'absorption directe du nectar vers le ventricule par action mécanique du pompage par le proboscis et la bouche (Gary et Lorenzen 1976 A152; Roces et Blatt 1999, A162).

D'un point de vue des dépenses énergétiques résultant de l'activité de butinage, on peut considérer que la majeure partie des dépenses (80%) est due à l'activité de vol pur, les 20% restant étant alloués aux autres activités (déplacements sur le capitule, récolte, toilettage). Si l'on considère qu'une abeille consacre environ 10 heures par jour à une activité de vol pur, elle aura donc besoin au total de 115 mg de sucres par jour pour ces dépenses énergétiques de vol auxquels s'ajouteront 23 mg de sucres consommés pour les activités annexes soit un total de 138 mg de sucres par jour.

Le nectar de tournesol contient en moyenne 40 % de sucres (Bonjean, 1993, A78). Une butineuse doit donc consommer en moyenne 345 mg de nectar pour 12 heures de butinage quotidien. Si l'abeille consomme du miel, elle aura besoin de 172 mg de miel, sachant que le miel contient 80 % de sucres (White, 1975, A164).

Si la zone de butinage est constituée de champs traités Gaucho, en raison de sa fidélité florale, l'abeille s'intoxiquera avec 100% de nectar contaminé pour son vol retour. Si les champs ne sont pas traités, la contamination sera de 0%. Cependant, si l'on considère l'ensemble des butineuses de la ruche, on pourra trouver des taux intermédiaires de contamination selon le paysage culturel autour de la ruche. En effet, les abeilles spécialisées dans la récolte de nectar de tournesol pourront ou non s'intoxiquer selon le traitement des champs, d'autres abeilles spécialisées dans la récolte de nectar d'autres espèces florales ne consommeront pas d'imidaclopride lors de leur vol retour

Quel que soit le trajet effectué (vol aller ou retour) le niveau d'intoxication de l'ensemble des butineuses sera donc fonction du paysage culturel entourant la ruche et déterminant la proportion de nectar contaminé que l'abeille ingère.

Ce scénario qui envisage la consommation d'une abeille au cours de quelques heures se rapproche du cas d'une **intoxication aiguë**. Si l'abeille ne meurt pas durant cette période et continue à butiner pendant les jours suivants, ce scénario se rapproche du cas d'une **intoxication chronique**.

Les dosages d'imidaclopride dans le nectar de tournesol ont conduit à des teneurs de 1,9 ppb (Stork, 1999, M5). Le calcul de la quantité d'imidaclopride éventuellement consommée par une abeille au cours de 12 heures d'activité de butinage figure dans le Tableau XLVII.

**Tableau XLVII : Quantités théoriques d'imidaclopride contenues dans 345 mg de nectar de tournesol consommé par les butineuses pour 12 heures d'activité de butinage quotidienne**

<b>Concentrations d'imidaclopride contenues dans le nectar = 1,9 (µg/kg ou ppb)</b>		
<b>Pourcentages de nectar de tournesol contaminé par l'imidaclopride</b>		<b>Quantités d'imidaclopride absorbé par les butineuses au cours de 12 heures</b>
	<b>100%</b>	655
	<b>80 %</b>	524
	<b>60 %</b>	393
	<b>40 %</b>	262
	<b>20 %</b>	131

#### **Scénario 5 : Thermorégulation par les abeilles d'intérieur, consommation du miel de réserve**

Le nectar et le miel stockés dans la ruche seront consommés par les abeilles, généralement âgées de moins de 3 semaines pour combler leurs dépenses énergétiques qui sont fonction de l'activité (thermorégulation, nettoyage des cellules, nourrissage du couvain (cas déjà traité), récolte et emmagasinement du nectar et du pollen). Si ce nectar et ce miel sont contaminés, les abeilles pourront, éventuellement, s'intoxiquer.

La thermorégulation étant l'activité la plus coûteuse d'un point de vue énergétique et l'estimation des dépenses énergétiques liées à toutes les activités prises séparément étant impossible, nous nous intéresserons seulement aux besoins énergétiques d'une abeille pour assurer la régulation de la température qui est dépendante de la température extérieure et donc de la saison.

La quantité de nectar consommé par une ouvrière âgée de moins de trois semaines (nourrice) peut être évaluée en fonction de ses dépenses énergétiques qui sont elles même fonction de son activité (thermorégulation, nettoyage des cellules, nourrissage du couvain, récolte et emmagasinement du nectar et pollen).

La thermorégulation dépend de la température extérieure : lorsque celle-ci est basse les abeilles produisent de la chaleur afin de maintenir une température adéquate au sein de la ruche. En cas de température élevée, les abeilles peuvent également « ventiler » et produire de l'air froid afin de rafraîchir la ruche.

Du point de vue des dépenses énergétiques, la thermogenèse est l'activité la plus coûteuse.

Selon la période de l'année, elle vise soit à assurer une température constante du couvain d'environ 34°C (période printemps-été-automne), soit à maintenir la température de la colonie entre 15°C au centre de l'essaim d'abeilles et à 5°C en périphérie (période hivernale) (Winston 1987, A85).

La quantité d'énergie dépensée pour arriver à cette température dépend évidemment, de la température extérieure qui fluctue selon les saisons, les jours et même les moments de la journée.

Jusqu'à la fin de l'hiver, le miel consommé par les abeilles pour assurer la température du couvain est encore issu du miel stocké, puis est progressivement remplacé par du miel des différentes espèces florales disponibles au cours de la saison apicole. A l'automne, les nourrices puisent à nouveau dans le miel de réserves nouvellement stocké.

Durant l'hiver, le miel consommé par les abeilles pour assurer une température viable à l'intérieur de la ruche est du miel de réserve, constitué à partir du nectar de la dernière espèce florale butinée. Ainsi, selon les régions et les pratiques apicoles (transhumance), le miel de tournesol peut représenter jusqu'à 80% du miel de réserve. Si ce miel de tournesol contient de l'imidaclopride, les abeilles risquent de s'intoxiquer et le niveau d'intoxication sera fonction de la proportion de miel contaminé qu'elle ingère. Le niveau de contamination du miel de réserve dépend donc à la fois de la dernière essence florale butinée (tournesol, colza, etc..) et de la proportion de champs traités ou non Gaucho si cette dernière espèce florale est du tournesol.

Il est établi qu'une colonie d'abeilles consomme en général 60 à 80 kg de miel par an (Moritz et Southwick 1992 ; Rosov 1944 ; Seeley 1985). Dans les pays tempérés et pendant l'automne, la colonie, composée généralement de 20 000 abeilles (Winston 1989, A85), consomme 8 à 16 kg de miel pour la thermogénèse (Free, 1977, A151) tandis qu'elle en consommera 19 à 25 kg pendant l'hivers (température de - 4°C à + 7°C) (Farrar 1952, 1960, A148 ; Dyce and Morse 1960, A146 Johansson and Johansson 1969, A154).

Compte tenu de la consommation plus importante de miel durant l'hiver, nous baserons nos estimations de PEC sur cette période qui représente, à notre sens, le pire cas.

Le miel de tournesol représente 0 à 80 % du miel de réserve selon les régions. Durant la période hivernale, l'abeille consommera donc, selon les pourcentages de miel de tournesol constituant le miel de réserve (20, 40, 60 et 80%) de 0,2 à 0,8 g de miel de tournesol pour assurer le maintien de la température, ce qui correspond à 0,5 à 2 g de nectar de tournesol. La quantité d'imidaclopride absorbée par les abeilles sera alors fonction du pourcentage de miel de tournesol contaminé stocké dans le corps de ruche (par exemple 20, 40, 60, 80, 100%).

Ne disposant pas à ce jour de données sur l'éventuelle stabilité chimique de l'imidaclopride lors de la transformation du nectar en miel et dans le miel stocké, la première évaluation de risque supposera le composé stable.

Le Tableau XLVIII indique, les quantités d'imidaclopride absorbées par les abeilles adultes qui consomment 0,2 à 0,8 g de miel de tournesol (provenant de la transformation de 0,5 à 2 g de nectar de tournesol) afin d'assurer une température de 15°C au centre de la ruche et de 5°C à la périphérie.

**Tableau XLVIII : Quantité théorique d'imidaclopride absorbée par les abeilles adultes pour assurer le maintien de la température au cours de la période hivernale (mi-octobre-fin mars)**

Concentrations d'imidaclopride contenu dans le nectar ou équivalent = 1,9 (µg/kg ou ppb)					
Pourcentages de nectar de tournesol contaminé par l'imidaclopride		Quantités d'imidaclopride absorbé par les adultes (pg)			
		Quantité de nectar absorbée (g)			
		0,5	1	1,5	2
	100%	950	1900	2850	3800
	80%	760	1520	2280	3040
	60%	570	1140	1710	2280
	40%	380	760	1140	1520
	20%	190	380	570	760

## 7 EVALUATION DES RISQUES

Les risques sont évalués par le rapport entre la concentration d'exposition (PEC) et la concentration prévisible sans effet pour les abeilles (PNEC). **Un rapport "PEC/PNEC" supérieur à 1 traduira un**

**risque préoccupant pour les abeilles tandis qu'un rapport inférieur à 1 pourra être considéré comme indiquant un risque non préoccupant.**

Les calculs des différents rapports correspondant aux différents niveaux d'exposition sont présentés sous forme de tableaux. La procédure classiquement adoptée lorsqu'une évaluation des risques est réalisée pour une substance chimique, qu'elle soit nouvelle (Directive 67/548/CE) ou existante (règlement 793/93), est d'effectuer un premier calcul de risque assez rudimentaire. Si un risque est mis en évidence, le rapport PEC/PNEC doit être affiné, soit en affinant la partie "exposition" c'est à dire la PEC, soit en affinant la partie "effets", c'est à dire la PNEC.

Dans notre cas, le calcul des PEC ne peut pas être affiné en l'état actuel des connaissances, car les scénarios d'exposition utilisent toutes les données scientifiques qui ont été trouvées dans la littérature scientifique et technique à ce jour.

La procédure classique d'affinage des PNEC suivie pour l'évaluation des risques présentés par une substance chimique, est la suivante. Dans le cas général, les seules données disponibles sont les données correspondant à des essais de toxicité aiguë. La PNEC est alors calculée sur la base de ces données en utilisant un facteur d'incertitude élevé. Si un rapport PEC/PNEC préoccupant est mis en évidence, des essais de toxicité chronique vont être exigés par les autorités et réalisés par les déclarants de la substance. Une nouvelle PNEC va être calculée sur la base de ces nouveaux résultats d'essais, en utilisant un facteur d'incertitude moins élevé que celui appliqué aux essais de toxicité aiguë. Si le rapport PEC/PNEC reste préoccupant, on demande alors des essais se rapprochant de plus en plus des conditions naturelles, par exemple des essais sublétaux, pour lesquels le facteur d'incertitude utilisé pourra être moins important. Un nouveau rapport va être calculé. La procédure va s'arrêter lorsque l'affinage de la PNEC sera arrivé à son terme, c'est à dire lorsqu'elle sera basée sur les essais correspondant le plus aux conditions réelles environnementales, généralement les essais en plein champ dans le cas des abeilles butineuses. Pour les abeilles d'intérieur qui ne sortent pas de la ruche, les études de plein champ portant sur le comportement de butinage ne constituent pas les conditions environnementales les plus représentatives, l'affinage s'arrêtera aux études en laboratoires testant les effets sublétaux engendrés par l'administration répétée d'imidaclopride.

Dans le cas de l'évaluation des risques présentés par l'imidaclopride pour les abeilles, les estimations de risques vont être présentées comme si cette procédure d'affinage des PNEC avait été suivie. Les commentaires sus cités par les valeurs de risques calculés seront basés sur cet affinage maximal de la PNEC.

Dans les tableaux, les valeurs de risques ont été délibérément arrondies à une décimale pour des valeurs inférieures à 5 et à l'unité pour des valeurs supérieures.

## **7.1 Scénario 1 : consommation de pollen par les larves**

L'évaluation de risques présentés par l'imidaclopride pour les larves ne peut être développée en raison de l'absence de données de toxicité disponibles rendant impossible le calcul d'une PNEC et à fortiori du rapport PEC/PNEC.

## 7.2 Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices

**Tableau XLIX : Calcul des risques correspondant au scénario d'exposition n°2 pour le pollen de tournesol (intoxication pendant 10 jours)**

Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices					
<i>Cas du pollen de tournesol</i>					
Rapport PEC/PNEC	PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen de fleurs contaminé (pg)				
	(20% contamination) 40	(40% contamination) 80	(60% contamination) 121	(80 % contamination) 161	(90 % contamination) 181
A partir des données de toxicité aiguë par voie orale					
40	1	2	3	4	4,5
A partir des données de toxicité chronique par voie orale <sup>11</sup>					
1,2	33	67	101	134	151
A partir des données de toxicité sublétales par voie orale (études en laboratoire)					
intox. aiguë 20	2	4	6	8	9
intox. chronique 20	2	4	6	8	9

**Un ratio supérieur à 1 est mis en évidence pour des taux de contamination de 20 à 90% du pollen de fleurs, indiquant un risque pour les abeilles. Le rapport PEC/PNEC devient supérieur à 1 pour un pourcentage de pollen contaminé de 10%.**

Dans ce scénario 2, un affinage du rapport PEC/PNEC est possible. Un affinage de la PNEC pourrait être réalisé sous tunnel ou en plein champ en prenant en compte des paramètres internes à la ruche : ex développement du couvain. En effet, les données de plein champ et sous tunnels disponibles à l'heure actuelle ne sont pas représentatives de l'abeille d'intérieur car basées sur le comportement de butineuses.

La PEC donc le scénario d'exposition peut également être révisé par :

- le dosage de l'imidaclopride dans le pain d'abeille
- l'étude de la stabilité chimique de l'imidaclopride dans le pollen stocké dans la ruche et transformé en pain d'abeilles.

Ce scénario repose sur une hypothèse de stabilité de l'imidaclopride dans la ruche. Or, la transformation nécessaire à la production de pain d'abeille à partir du pollen pourrait avoir un effet sur la teneur en imidaclopride. On soulignera cependant la grande stabilité de la molécule en particulier dans les sols. Néanmoins, en cas de dégradation, il conviendra de se poser la question de l'éventuelle action toxique des métabolites. De nouvelles données sont donc nécessaires afin d'infirmer ou confirmer cette hypothèse. Néanmoins, compte tenu du fait que les nourrices consomment également

<sup>11</sup> On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée à partir de la DL50 de l'étude de Suchail.

du miel pour faire face à leurs dépenses énergétiques, ces résultats sont à mettre en parallèle avec les résultats d'évaluation de risques pour le scénario 5

**Tableau L : Calcul des risques correspondant au scénario d'exposition n°2 pour le pollen de maïs (intoxication pendant 10 jours)**

Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices					
<i>Cas du pollen de maïs</i>					
Rapport PEC/PNEC	PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen contaminé (pg)				
	(20 % pollen de panicules) 42	(40 % pollen de panicules) 84	(60 % pollen de panicules) 126	(80 % pollen de panicules) 168	(80 % pollen de panicules) 181
A partir des données de toxicité aiguë par voie orale					
40	1	2,1	3,1	4,2	4,5
A partir des données de toxicité chronique par voie orale <sup>12</sup>					
1,2	35	70	105	140	151
A partir des données de toxicité sublétales de laboratoire par voie orale					
intox. aiguë 20	2,1	4,2	6,3	8,4	9
intox. chronique 20	2,1	4,2	6,3	8,4	9

Pour les calculs effectués à partir des dosages d'imidaclopride dans le pollen de panicules, un ratio supérieur à 1 est mis en évidence pour des taux de contamination de 20 à 80% de pollen indiquant un risque pour les abeilles. Le rapport PEC/PNEC devient supérieur à 1 pour un pourcentage de pollen contaminé de 10%. Les remarques précédentes concernant l'affinage du rapport PEC/PNEC sont valables pour le pollen de maïs.

<sup>12</sup> On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée à partir de la DL50 de l'étude de Suchail.

### 7.3 Scénario 3 : les butineuses de pollens : intoxication par voie orale

**Tableau LI : Calcul des risques correspondant au scénario d'exposition n°3 pour le pollen de tournesol (intoxication pendant 1 journée de butinage)**

Scénario 3 : les butineuses de pollen		
<i>Cas du pollen de tournesol</i>		
Rapport PEC/PNEC	PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen contaminé (pg)	
	10 mg de pollen ingéré 3,3	45 mg de pollen ingéré 15
PNEC (pg)		
A partir des données de toxicité aiguë par voie orale		
40	0,08	0,37
A partir des données de toxicité chronique par voie orale <sup>13</sup>		
1,2	2,7	12
A partir des données de toxicité sublétales de laboratoire par voie orale		
1 traitement 20	0,16	0,74
Traitement réitéré 20	0,16	0,74
A partir des données de toxicité sublétales sous tunnel par voie orale		
7,5	0,44	2
A partir des données de toxicité sublétales plein champ par voie orale		
50	0,07	0,3

**Tableau LII : Calcul des risques correspondant au scénario d'exposition n°3 pour le pollen de maïs (intoxication pendant 1 journée de butinage)**

Scénario 3 : les butineuses de pollen		
<i>Cas du pollen de maïs</i>		
Rapport PEC/PNEC	PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen contaminé (pg)	
	10 mg de pollen ingéré 3,5	45 mg de pollen ingéré 16
PNEC (pg)		
A partir des données de toxicité aiguë par voie orale		
40	0,09	0,4
A partir des données de toxicité chronique par voie orale <sup>13</sup>		
1,2	2,9	13
A partir des données de toxicité sublétales de laboratoire par voie orale		
1 traitement 20	0,17	0,79
Traitement réitéré 20	0,17	0,79
A partir des données de toxicité sublétales sous tunnel par voie orale		
7,5	0,63	2,1
A partir des données de toxicité sublétales plein champ par voie orale		
50	0,07	0,32

<sup>13</sup> On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée à partir de la DL50 de l'étude de Suchail.

Les évaluations à partir des données de toxicité sublétales plein champ ne conduisent pas à un risque significatif que ce soit pour l'intoxication par du pollen de tournesol ou de maïs (Tableau LI et Tableau LIII). Cependant en absence de données scientifiques, le pourcentage de pollen ingéré repose uniquement sur une estimation de la part des membres du CST, les rapports obtenus sont donc à relativiser.

Un affinage du rapport PEC/PNEC est possible, en particulier par la détermination de la quantité de pollen ingérée par les butineuses lors de la confection des pelotes

Le calcul des risques engendrés par une intoxication topique d'imidaclopride lors de la confection de pelotes par les butineuses n'a pas été développé compte tenu de son improbabilité.

#### 7.4 Scénario 4 : les butineuses de nectar de tournesol

Tableau LIII : Calcul des risques correspondant au scénario d'exposition n°4 pour le nectar de tournesol (intoxication pendant 1 journée de butinage)

Scénario 4 : les butineuses de nectar de tournesol					
PEC/PNEC	PEC Concentrations d'exposition en fonction du % de nectar consommé contaminé par l'imidaclopride (pg)				
PNEC (pg)	(20%)	(40 %)	(60 %)	(80 %)	(100 %)
	131	262	393	524	655
A partir des données de toxicité aiguë par voie orale					
40	3,3	7	10	13	16
A partir des données de toxicité chronique par voie orale <sup>14</sup>					
1,2	109	218	328	437	546
A partir des données de toxicité sublétales de laboratoire par voie orale					
1 traitement 20	7	13	20	26	33
Traitement réitéré 20	7	13	20	26	33
A partir des données de toxicité sublétales sous tunnel par voie orale					
7,5	17	35	52	70	87
A partir des données de toxicité sublétales en plein champ par voie orale					
50	2,6	5	8	10	13

Un ratio supérieur à 1 est mis en évidence lorsque 20% du nectar consommé est contaminé par l'imidaclopride indiquant un risque pour les abeilles. Le rapport PEC/PNEC devient supérieur à 1 dès lors que 8% du nectar consommé est contaminé. La seule possibilité d'affinage du rapport serait de réviser la PEC donc le scénario d'exposition. Dans le cas du scénario 4, les éléments devant être confirmés sont :

- la quantité d'imidaclopride contenue dans le nectar de tournesol, la valeur utilisée dans le scénario ne repose que sur une seule étude validée.
- La stabilité chimique de l'imidaclopride dans le nectar stocké dans la ruche (vol aller).

#### 7.5 Scénario 5 : les abeilles d'intérieur

Tableau LIV : Calcul des risques correspondant au scénario d'exposition n°5 pour le miel de tournesol

Scénario 5 : les abeilles d'intérieur, régulation de la température pendant la période hivernale
<i>Cas des abeilles adultes</i>

<sup>14</sup> On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée à partir de la DL50 de l'étude de Suchail.

Rapport PEC/PNEC	PEC (pg) Concentrations d'exposition en fonction de la quantité de miel absorbé et de la proportion de miel contaminé ou équivalent (1 à 2 g de nectar)									
	0,2 g de miel (0,5g de nectar)					0,8g de miel (2g de nectar)				
PNEC(pg)	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%
	190	380	570	760	950	760	1520	2280	3040	3800
A partir des données de toxicité aiguë par voie orale										
40	4,75	9,5	14	19	24	19	38	57	76	95
A partir des données de toxicité chronique de laboratoire par voie orale <sup>15</sup>										
1,2	158	317	475	633	792	633	1266	1900	2533	3166
A partir des données de toxicité sublétales de laboratoire par voie orale										
1 traitement 20	9,5	19	29	38	48	38	76	114	152	190
Traitement réitéré 20	9,5	19	29	38	48	38	76	114	152	190

Les abeilles d'intérieur ne sortant pas de la ruche, les données de toxicité chronique sous tunnel et en plein champ n'ont pas été prises en compte dans l'évaluation des risques de ce scénario.

**L'évaluation des risques pour les abeilles d'intérieurs assurant la thermorégulation conduit à des rapports préoccupants.** La seule possibilité d'affinage du rapport serait d'affiner la PEC donc le scénario d'exposition. Dans le cas du scénario 5, les éléments devant être confirmés sont :

- La quantité d'imidaclopride contenue dans le miel, aucune valeur n'étant à notre disposition.
- la stabilité de l'imidaclopride lors de la transformation du nectar en miel et au cours du temps lors du stockage du miel. En effet, l'évaluation de risques repose sur l'hypothèse d'une stabilité du composé.

## Conclusion

L'évaluation des risques pour les abeilles présentés par l'enrobage Gaucho® de semences a été menée après avoir élaboré des scénarios originaux susceptibles d'être utiles pour l'évaluation d'autres

<sup>15</sup> On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée à partir de la DL50 de l'étude de Suchail.

substances chimiques phytosanitaires. Ces scénarios sont basés sur les connaissances de spécialistes en apiculture, de la biologie des abeilles et sur des données issues de la littérature scientifique. Une étude bibliographique exhaustive a rassemblé l'ensemble des données de toxicologie des abeilles et les données concernant les troubles comportementaux relatifs à l'utilisation d'imidaclopride aux différentes étapes de la vie de l'abeille. Les données de terrain rapportées par les apiculteurs au sein du CST ou ayant été auditionnés ainsi que celles fournies par le producteur de l'imidaclopride en enrobage de semences, ont été prises en compte.

Quel que soit les scénarios, l'évaluation des risques présentés par l'imidaclopride en enrobage de semences conduit, d'une manière générale, à un rapport PEC/PNEC supérieur ou égal à 1. Les rapports obtenus dans le cas du tournesol et du maïs enrobé Gaucho sont similaires et sont reportés dans le Tableau LV

**Dans l'état actuel de nos connaissances, selon les scénarios développés pour évaluer l'exposition et selon les facteurs d'incertitude choisis pour évaluer les dangers, les rapports PEC/PNEC obtenus sont préoccupants. Ils sont en accord avec les observations de terrain rapportées par de nombreux apiculteurs en zones de grande culture (maïs, tournesol), concernant la mortalité des butineuses (scénario 4), leur disparition, leurs troubles comportementaux et certaines mortalités d'hiver (scénario 5).**

**En conséquence, l'enrobage de semences de tournesol Gaucho® conduit à un risque significatif pour les abeilles de différents âges, à l'exception des butineuses lorsqu'elles ingèrent du pollen lors de la confection de pelotes (scénario 3).**

**En ce qui concerne l'enrobage Gaucho® de semences de maïs, le rapport PEC/PNEC s'avère, comme pour le tournesol, préoccupant dans le cadre de la consommation de pollen par les nourrices, ce qui pourrait entraîner une mortalité accrue de celles-ci et être un des éléments de l'explication de l'affaiblissement des populations d'abeilles encore observé malgré l'interdiction du Gaucho® sur tournesol.**

**Enfin, étant donné que d'autres facteurs peuvent contribuer à l'affaiblissement des colonies d'abeilles, il convient que les recherches soient poursuivies sur la fréquence, les mécanismes et les causes de ces symptômes.**

**Tableau LV : Récapitulatif des résultats du rapport PEC/PNEC déterminé pour les différents scénarios**

Scénario	Rapport PEC/PNEC selon le pourcentage de contamination des produits consommés		
	A partir d'une exposition à du Tournesol traité Gaucho	A partir d'une exposition à du Maïs traité Gaucho	Commentaires relatifs aux scénarios
Scénario 1 : consommation de « bouillie larvaire » par les larves	Rapport PEC/PNEC non déterminé par absence de données de toxicité		<b>Absence de données :</b> - de toxicité - de dosages de résidus dans la gelée royale et la « bouillie larvaire »

			- sur la stabilité de l'imidaclopride au cours du stockage dans la ruche
Scénario 2 : consommation de pollen par les nourrices	2 à 9 (151*)	2,1 à 9 (151*)	<b>Absence de données :</b> - sur la stabilité de l'imidaclopride au cours du stockage du pollen dans la ruche - de dosages de résidus dans le pain d'abeilles
Scénario 3 : consommation de pollen par les butineuses	0,07 à 0,3 (12*)	0,07 à 0,32 (13*)	<b>Scénario reposant sur une estimation</b> de la proportion de pollen ingéré lors de la confection de pelotes
Scénario 4 : consommation de nectar par les butineuses	2,6 à 13 (546*)	maïs = plante non nectarifère	<b>Absence de données :</b> - de dosages de résidus dans le miel stocké à la ruche <b>Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar</b>
Scénario 5 : consommation de miel par les abeilles d'intérieur	9,5 à 190 (3166*)	maïs = plante non nectarifère	<b>Absence de données :</b> -de dosages d'imidaclopride dans le miel -sur la stabilité de l'imidaclopride dans le miel lors de son stockage dans la ruche <b>Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar</b>

\* ratio obtenu à partir des données de Suchail (cas extrême)

## TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR L'ACQUISITION DES DONNEES AYANT FAIT DEFAUT AU COURS DE L'EVALUATION DES RISQUES

### **8 RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES DONNEES D'EXPOSITION DES ABEILLES**

#### **8.1 Données à acquérir concernant l'imidaclopride et ses métabolites**

Les experts du CST ont conclu à la validation de la méthode analytique de dosages d'imidaclopride pour les sols, végétaux et pollen. En ce qui concerne les dosages d'imidaclopride dans le nectar et le miel, les limites de quantification et de détection sont actuellement trop élevées (>1 ppb et 0,3 ppb, respectivement). Une amélioration de la technique de dosage dans ces produits permettant une diminution de ces limites est donc demandée.

Devant la difficulté de prélever des quantités suffisantes de nectar à partir des fleurs, les experts du CST proposent de prélever le nectar dans le jabot des butineuses sur le champ ou à l'entrée de la ruche.

Parallèlement d'autres prélèvements et dosages doivent être envisagés afin de conclure quant à :

- la présence de métabolites de l'imidaclopride dans les parties végétales visitées par les abeilles (pollen, nectar, miel)
- la possibilité d'accumulation d'imidaclopride et de ses métabolites dans le sol après plusieurs traitements successifs. A ce titre les experts du CST préconisent des études conduites en milieu non ouvert.
- la possibilité d'absorption d'imidaclopride résiduel par des plantes non traitées Gaucho mais cultivées sur sol ayant reçu un traitement Gaucho les années précédentes.
- la présence d'imidaclopride dans les différents produits de la ruche, à savoir : la bouillie nutritive des larves d'ouvrières, la gelée royale, le miel, le pollen stocké en rayon (pain d'abeille), la cire...
- la stabilité chimique de l'imidaclopride au cours du stockage et de la transformation du pollen et du nectar dans la ruche.

#### **8.2 Recommandations générales**

Les échantillons doivent être prélevés selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Un historique détaillé doit accompagner chaque échantillon afin d'assurer une bonne traçabilité. La nature et l'historique des échantillons lors de l'analyse des données doivent être en accord avec les fiches de prélèvement.

Le nombre d'échantillons doit être suffisant pour chaque condition. Un minimum de 20 échantillons nous semble nécessaire.

Les échantillons doivent être ensuite rapidement congelés et stockés sans interruption de la chaîne du froid au minimum à -20°C afin d'éviter toute dégradation de la substance active. La possible dégradation de la substance active lors du stockage des échantillons doit être préalablement étudiée en fonction du délai et des conditions de stockage.

Enfin les résultats complets (données brutes et analysées) doivent être présentés clairement.

### **9 RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES DONNEES DE TOXICITE PAR ADMINISTRATION REITEREE DE SUBSTANCE ACTIVE.**

### 9.1 Données à acquérir concernant l'imidaclopride et ses métabolites

Il est indispensable d'acquérir des données sur la toxicité de l'imidaclopride et de ces métabolites pour les larves. Les études devront être conduites en laboratoire et en conditions de semi-champ grâce à des méthodes adéquates qui seront à mettre au point et à valider.

De la même façon il est nécessaire d'évaluer la sensibilité des nourrices au produit en conditions de laboratoire et de semi champ.

### 9.2 Recommandations générales relatives aux études des effets létaux ou sublétaux.

Devant la relative hétérogénéité des résultats et le nombre d'études non validées il sera nécessaire de développer des protocoles standardisés pour les études de toxicité par traitement réitéré. Ces protocoles devront être établis par des experts en Apidologie.

Parmi les points importants que devront respecter ces protocoles, nous suggérons :

- Le respect des critères de validation cités dans le rapport.
- Lors des études d'intoxication suite à des traitements réitérés administrés par voie orale, la quantité de substance active (imidaclopride ou dérivé) testée doit être mesurée en quantité absorbée (ng / abeille)..
- Les concentrations d'imidaclopride et de ses métabolites doivent être vérifiées en fin d'expérience à cause de sa dégradation à la lumière au cours du temps
- Les nourrisseurs contenant de l'imidaclopride doivent être bien protégés de la lumière (mise au point d'un nourrisseur type)
- Chaque étude doit comporter un traitement témoin, un traitement avec un produit chimique de haute toxicité (diméthoate) comme référence ( $0,11\mu\text{g}/\text{abeille} < \text{DL50} < 0,26\mu\text{g}/\text{abeille}$  et  $0,11\mu\text{g}/\text{abeille} > \text{DL50} > 0,33\mu\text{g}/\text{abeille}$  pour une intoxication topique et une intoxication orale respectivement), un traitement avec chaque dose de substance active à tester (3 concentrations différentes minimum). Le traitement de référence doit permettre de contrôler qu'une absence éventuelle de toxicité n'est pas due à un caractère particulier des abeilles utilisées dans le test.
- Lors d'une dissolution du pesticide dans un solvant (ou d'une anesthésie des abeilles), 2 groupes témoins doivent être utilisés : un groupe témoin « non –traité », nourri avec un sirop constitué uniquement de saccharose (ou non anesthésié), un groupe témoin « solvant », nourri avec du sirop contenant le solvant utilisé à la même concentration que dans les groupes traités (ou anesthésié)
- La répartition aléatoire des animaux afin de limiter la variabilité des études.
- L'utilisation d'une mortalité corrigée dans le traitement des résultats ainsi que la prise en compte des abeilles mortes lors de l'évaluation de la quantité de sirop ingéré. Les résultats bruts devront apparaître dans le rapport final.
- L'utilisation de tests statistiques permettant de montrer des effets significatifs ou non entre les groupes témoins et les animaux traités devra être systématique. Ces tests devront être appropriés aux conditions expérimentales et prendre en compte la répétition des intoxications (suggestions : ANOVA à mesures répétées).

### 9.3 Recommandations générales relatives aux études en enceinte et en champ

En plus des précédentes recommandations, les critères suivants devront être respectés :

- Les études sur colonies (développement, production, consommation, etc.) doivent comprendre un effectif minimum de quelques milliers d'abeilles (10 % de l'effectif d'une colonie normale, dans les conditions naturelles)
- Les observations comportementales doivent:
  - être ciblées (grille de comportement à préciser),
  - être étalées dans le temps (plusieurs jours ou plusieurs semaines),
  - être régulières (fréquence et date),
  - comprendre la période post-test (effets retardés)
  - utiliser des abeilles marquées,

- Les études qui testent l'effet de pollens, nectars ou miels contaminés devraient, au préalable, vérifier la teneur en imidaclopride dans ces matrices (limite de quantification inférieure ou égale à 1 ppb) et la biodégradation du contaminant au cours du temps.
- L'historique des cultures traitées doit être connu (traitements, cultures précédentes etc...)
- Lors de tests en plein champs avec intoxication « sur fleurs », l'aire des cultures doit être suffisamment importante pour minimiser la probabilité que les abeilles exploitent d'autres cultures. De même, lorsque la substance active est disposée sur nourrisseur, la distance entre la ruche et le nourrisseur doit être suffisamment grande.
- Une analyse pollinique doit être exigée sur un échantillon de butineuses (pollen dans le contenu stomacal et dans les pelotes) pour déterminer l'exposition des abeilles aux plantes contaminées

## **10. TRAVAUX A REALISER POUR COMPLETER L'ETUDE MULTIFACTORIELLE**

Le rapport devra être progressivement enrichi des travaux futurs des membres du sous-groupe métrologie du CST. Il s'agira de :

- Réaliser pour le fipronil une évaluation des risques du même type que celle effectuée pour l'imidaclopride,.
- Analyser les autres facteurs impliqués dans les pertes d'abeilles (maladies, pratiques apicoles et agricoles, variétés génétiques pour les plantes cultivées et traitées, influence des terpènes, ...) en étroite collaboration avec le sous-groupe réseau.
- Faire l'inventaire des troubles des abeilles constatés dans les autres pays.

**L'évaluation des risques pour les abeilles engendrés par l'enrobage Gaucho® de semences a été menée en prenant en compte l'ensemble des données d'exposition, de toxicité et en élaborant des scénarios reflétant au mieux, l'intoxication des abeilles dans leurs environnement naturel. La démarche utilisée pour l'évaluation de risques, les différents scénarios mis au point ainsi que les recommandations établies suite aux problèmes rencontrés lors de l'évaluation des données devront être utilisés en phase d'homologation lors des études de risques d'autres produits insecticides à propriétés systémiques utilisés en traitement de sol ou de semences. L'extension aux autres types d'insecticides est également envisageable.**

## DEFINITIONS

### **Concernant les techniques utilisées pour mettre en évidence et doser l'imidaclopride présent dans différents substrats (miel, pollen, tournesol etc...)**

- GC-MS/MS: chromatographie phase gazeuse, spectromètre de masse en tandem
- HPLC-MS : chromatographie liquide haute performance, spectromètre de masse
- HPLC MS/MS : chromatographie liquide haute performance, spectromètre de masse en tandem
- AMD : développement multiple automatisé
- LD: Limite de détection : valeur en dessous de laquelle on ne détecte plus le composé
- LQ: Limite de quantification : valeur en dessous de laquelle on ne dose plus le composé

### **Concernant les variables mesurées et unités de mesures**

- DL50: dose létale 50 : dose induisant la mortalité de 50% des individus intoxiqués
- LC 50: concentration létale 50 : concentration induisant la mortalité de 50% des individus intoxiqués
- LOEC: concentration la plus faible d'une substance conduisant à un effet
- NOEC: concentration la plus forte d'une substance qui ne conduit pas à un effet
- PEC: Concentration prédite d'une substance à laquelle l'environnement va être soumis
- PNEC: Concentration prédite d'une substance à laquelle l'environnement va être soumis et prévue sans effet sur les organismes de l'environnement à laquelle l'environnement
- Ppb : partie per billion : unité de mesure correspondant, dans notre rapport, à des concentrations en  $\mu\text{g}/\text{kg}$

### **Concernant la validation des études**

- Etudes Validés : les études ont été validés par les membres du CST selon les recommandations du "*Technical Guidance Documents*" à savoir la qualité de l'étude en relation avec la méthodologie, la cohérence des résultats. Les données ont été analysées en respectant la manière dont a été conduite l'étude et interprété les résultats.