

## **Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole**

*Séance du mercredi 18 décembre 2002*

### **Evaluation des risques pour les abeilles de l'utilisation de la préparation Gaucho (imidaclopride) utilisée pour le traitement de semences de maïs**

*Avis de la commission sur la saisine du ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et  
des affaires rurales (CET 2002-008), en date du 16 octobre 2002*

Bien que le maïs ne soit pas considéré comme une plante mellifère, car les abeilles n'y prélèvent pas de nectar, il existe un risque d'exposition des abeilles à son pollen, le maïs étant une source de pollen en période estivale (environ 10 jours fin juillet).

On estime qu'à l'heure actuelle, environ 50% des semences maïs sont traitées GAUCHO à la dose de 0,98 mg d'imidaclopride/grain.

L'évaluation des risques pour les abeilles liés à l'utilisation de l'imidaclopride en enrobage de « semence maïs » est réalisée selon la méthodologie classique de l'évaluation de risque, méthodologie reposant sur la comparaison entre le niveau d'exposition des organismes et les dangers liés à la molécule.

Dans ce cas précis, le niveau d'exposition des abeilles correspond à la dose ingérée par voie orale suite à sa consommation de pollen « contaminé ». Celle-ci sera estimée à l'aide d'un scénario d'exposition. Les dangers liés à l'imidaclopride sont quant à eux estimés à partir des essais d'écotoxicité aiguë, ou chronique réalisés au laboratoire en serre ou en plein champ.

Les données utilisées dans ce rapport proviennent d'études analytiques et toxicologiques analysées et validées par le comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles (CST).

#### **I - Evaluation des expositions**

Le pollen est consommé par 2 catégories d'individus dans la ruche, les adultes âgés de 1 à 10 jours et les larves principalement aux 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours de leur vie, ce qui conduit à envisager 2 types de scénario.

Scénario adulte : Les adultes âgés de 1 à 10 jours utilisant du pollen pour le développement de leurs glandes nourricières et la production de la « gelée royale » pour les larves.

Scénario larves : Les larves consommant du pollen principalement aux 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours de leur vie.

A ce jour, compte tenu des données disponibles concernant la toxicité de l'imidaclopride, il n'est possible d'envisager que le scénario « adulte ».

L'évaluation de la dose ingérée nécessite la connaissance d'une part de la consommation de pollen par une jeune ouvrière adulte et d'autre part la teneur en imidaclopride dans le pollen consommé.

### ***1 - 1 - Evaluation de la teneur en imidaclopride dans les panicules***

Bien que ces données ne soient pas pertinentes pour l'évaluation des risques des abeilles puisque les panicules ne sont pas consommés par les abeilles, nous rapportons ci-dessous, à titre d'informations, les données disponibles. Cette estimation est réalisée à partir des études réalisées par M. Bonmatin du Centre de Biophysique moléculaire du CNRS.

Deux séries d'analyses ont été réalisées par ce laboratoire :

1. Campagne 1998-1999 portant sur 33 échantillons de maïs dont 24 déclarés GAUCHO (12 échantillons tige + feuille, 8 panicules et 4 fleurs femelles) et 9 (5 échantillons tige + feuille et 4 panicules) provenant de cultures déclarées non traitées GAUCHO.
2. Campagne 2001 portant sur 26 échantillons de panicules dont 16 provenant de cultures traitées GAUCHO et 10 de cultures non traitées.

Pour ces deux campagnes, les analyses ont été réalisées par le laboratoire BIOTEC d'Orléans selon un protocole (HPLC – MS – MS) validé par le CST. Les limites de quantification et de détection sont de respectivement de 1 ppb et 0,14 ppb pour les campagnes 1998-1999 et 2001 (tiges/feuilles) et de 1 et 0,25 ppb pour la campagne 2001 (panicules).

Pour la campagne 1998-1999, l'identification des échantillons est imprécise et les fiches de prélèvements sont souvent incomplètes ne donnant aucune précision sur le protocole de prélèvement et de stockage des échantillons. Par ailleurs, les caractéristiques des échantillons ne se recoupent pas toujours entre les rapports et les fiches des prélèvements révélant une mauvaise gestion des listes d'échantillons. Cela entraîne des ambiguïtés lors du traitement des

échantillons. De plus, il n'y a aucune information concernant la teneur en imidaclopride dans les sols avant culture.

L'ensemble de ces remarques conduit à ne pas prendre en compte les résultats de la campagne 1998-1999 dans la suite de l'évaluation.

A l'inverse, les fiches de prélèvement fournies pour la campagne 2001, permettent une bonne traçabilité des échantillons (prélèvements effectués par la société TESTAPI). Les renseignements disponibles concernent, entre autre, la nature de la culture, le type et le numéro d'échantillon, les antécédents de la culture et de traitement sur la parcelle depuis 4 ans. Les résultats de ces analyses seront donc pris en compte dans la suite de l'évaluation.

L'ensemble des résultats dans les panicules de maïs correspondant à la campagne 2001 est présenté dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Résultats des dosages d'imidaclopride dans les panicules de maïs (données validées par le CST)

Campagne 2001( Bonmatin, 2002)

Traitement : Bio = Culture Biologique ; Ø = non Gaucho ; G = Gaucho

Culture : M = Maïs ; B = Blé ; F = Feverolle

Type d'échantillon : P = Panicule - : Information non précisée

Code	Année/Traitements/Culture (variété)						Type ech.	Stade Croissance	Imid. (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Site	Identifiant	Date Prélèvement
	A	A-1	A-2											
10 FM 27/07/01 B-1	Ø	M (Madrigal)	G	M	G	M	P	BBCH65	18,0	0,25	1	Brienne la vieille (Gaucho A-1 à A-6)	Les Charmes	27/07/01
49 FM 23/08/01 B-3	Ø	M (Cergy)	Ø	B	Ø	F	Fl		ILD	0,25	1	Villeveque (49)	Mallièvre	23/08/01
72 FM 08/08/01 B-1	Ø	M (DK312)	Ø	M	-	-	Fl	BBCH69	ILD	0,25	1	Luché-Pringé (72)		08/08/01
36 FM 30/07/01 B-5	Ø	M	Ø	M	-	-	Fl	BBCH65	ILD	0,25	1	Villedieu / Chézelle (36)	La Beauce	30/07/01
36 FM 30/07/01 B-3	Ø	M (Lexxor)	Ø	M	-	-	Fl	BBCH65	ILQ	0,25	1	Villedieu / Chézelle (36)	La Beauce	30/07/01
36 FM 30/07/01 B-1	Ø	M (pélican)	-	-	-	-	Fl	BBCH65	ILQ	0,25	1	Villedieu / Chézelle (36)	La Beauce	30/07/01
49 FM 23/08/01 B-1	Bio	M (Monitor)	Bio	M	Bio	-	Fl	BBCH65	ILQ	0,25	1	Villeveque (49) Bio depuis A-4	La Salette	23/08/01
47 FM 16/08/01 B-3	Bio	M	Bio	B	Bio	F	Fl	60% floraison	ILQ	0,25	1	Pujols (47) ; Bio depuis 1969	CC75-76a	16/08/01
49 FM 26/07/01 B-1	Bio	M	Bio	M	-	-	Fl	BBCH63	1,1	0,25	1	Noyant (49) ; bio depuis 6 ans		26/07/01
47 FM 16/08/01 B-1	Bio	M	Bio	B	Bio	F	Fl	60% floraison	1,5	0,25	1	Pujols (47) ; Bio depuis 1969	CC75-76a	16/08/01
47 FM 01/08/01 I-2	G	M (Naudi)	G	M	-	-	Fl	30% floraison	1,6	0,25	1	Verteuil / Brugnac (47)	La Grangeotte	01/08/01
47 FM 01/08/01 I-2	G	M (Naudi)	G	M	-	-	Fl	30% floraison	2,1	0,25	1	Verteuil / Brugnac (47)	La Grangeotte	01/08/01
49 FM 26/07/01 I-1	G	M	G	M	-	-	Fl	BBCH65	3,4	0,25	1	Gennes	Avort	26/07/01
49 FM 26/07/01 I-2	G	M	G	M	-	-	Fl	BBCH65	7,2	0,25	1	Gennes	Avort	26/07/01
47 FM 31/07/01 I-2	G	M	G	M	G	M	Fl	-	16,0	0,25	1	Sembas (47)	Nadal	31/07/01
47 FM 31/07/01 I-1	G	M (asimut)	G	M	G	M	Fl	-	19,1	0,25	1	Sembas (47)	Nadal	31/07/01
72 FM 08/08/01 I-1	G	M (Lexxor)	Ø	M	-	-	Fl	BBCH65	ILQ	0,25	1	Luché-Pringé (72)	M semences	08/08/01
72 FM 08/08/01 I-2	G	M (Lexxor)	Ø	M	-	-	Fl	BBCH65	1,6	0,25	1	Luché-Pringé (72)	M semences	08/08/01
85 FM 24/07/01 I-2	G	M (Kussar)	Ø	M	-	-	Fl	BBCH65	4,9	0,25	1	Auzay / Le Langon (85)	St Médard	24/07/01
85 FM 24/07/01 I-1	G	M (Kussar)	Ø	M	-	-	Fl	BBCH66	6,7	0,25	1	Auzay / Le Langon (85)	St Médard	24/07/01
49 FM 01/08/01 I-2	G	M (Anjou 37)	Ø	B	-	-	Fl	BBCH65	6,9	0,25	1	Verrie (49)	Beaucheron	01/08/01
49 FM 01/08/01 I-1	G	M (Anjou 37)	Ø	B	-	-	Fl	BBCH65	10,7	0,25	1	Verrie (49)	Beaucheron	01/08/01
82 FM 18/07/01 I-2	G	M	-	-	-	-	Fl	-	2,5	0,25	1	Verdun sur Garonne / Bouillac (82)		18/07/01
82 FM 18/07/01 I-1	G	M	-	-	-	-	Fl	-	3,9	0,25	1	Verdun sur Garonne / Bouillac (82)		18/07/01
85 FM 24/07/01 I-4	G	M	-	-	-	-	Fl	BBCH65	16,1	0,25	1	Vouillé / Le Langon (85)	Les Marais	24/07/01
85 FM 24/07/01 I-3	G	M	-	-	-	-	Fl	BBCH65	16,9	0,25	1	Vouillé / Le Langon (85)	Les Marais	24/07/01

A la lecture de ce tableau, il apparaît que sur les 10 échantillons de panicules de maïs non traité GAUCHO, 3 échantillons ont une teneur inférieure à la limite de détection (0,25 ppb), 4 échantillons ont une teneur comprise entre la limite de détection (0,25 ppb) et la limite de quantification (1 ppb), 2 échantillons ont une teneur comprise entre 1 et 2 ppb et un échantillon une teneur de 18 ppb. A noter que ce dernier échantillon provient de panicules de maïs non GAUCHO cultivé sur un sol ayant des antécédents GAUCHO les deux années précédentes.

En ce qui concerne les panicules provenant de maïs GAUCHO, sur les 16 échantillons analysés, un a une teneur comprise entre la limite de détection (0,25 ppb) et la limite de quantification (1 ppb), les 15 autres ayant une teneur inférieure à 19 ppb.

La moyenne et la médiane des teneurs en imidaclopride dans l'ensemble des échantillons de panicule de maïs GAUCHO sont respectivement de 7,4 et 5,8 ppb. Pour la suite de l'évaluation, nous avons choisi d'utiliser la moyenne parce que plus pénalisante et traduisant un pire cas. Néanmoins, en raison de la grande dispersion des teneurs et de la non représentativité de la moyenne par rapport à leur répartition, la médiane aurait été plus représentative.

### ***1 - 2 - Evaluation de la teneur en imidaclopride dans le pollen***

Cette estimation est là encore réalisée à partir des études réalisées par M . Bonmatin du Centre de Biophysique moléculaire du CNRS.

Deux séries d'analyses ont été réalisées par ce laboratoire :

1. Campagne 1998-1999 portant sur 10 échantillons de pollen de maïs dont 6 échantillons de pollen de trappe, 2 pollens de panicules et 2 d'origine inconnue.
2. Campagne 2001 portant sur 9 pollens de trappe traités, 5 pollens de panicules de maïs non traité et 14 pollens de panicules de maïs traité.

Pour ces différentes campagnes, les méthodes analytiques sont les mêmes que celles validées par le CST pour les pollens de trappes et de fleur de tournesol.

Les limites de détection et de quantification sont de respectivement 0,43 ppb et 1 ppb pour le pollen de trappe et de 0,25 et 1 ppb pour les pollens de fleur.

Pour la campagne 1998-1999, de même que pour l'étude de résidus dans les végétaux, il existe de nombreuses incertitudes concernant le traitement et l'historique des échantillons. Dans ces conditions, cette étude n'est pas retenue dans la suite de l'évaluation.

Pour la campagne de 2001, les renseignements accompagnant les échantillons prélevés par TESTAPI sont précis, pertinents et homogènes. A l'inverse, les échantillons fournis par GDSA (groupement de défense sanitaire apicole) ne présentent aucune indication concernant le traitement. Ces derniers ne seront donc pas utilisés pour l'évaluation. L'ensemble des résultats retenu pour l'évaluation de la teneur en imidaclopride dans le pollen est présenté dans le Tableau 2.

En ce qui concerne le pollen de trappe, sur zone maïs GAUCHO, sur les 9 échantillons analysés, 5 ont une teneur en imidaclopride inférieure à la limite de détection (0,43 ppb), 2 une teneur comprise entre la limite de détection (0,43 ppb) et la limite de quantification (1 ppb) et 2 une teneur comprise entre la limite de quantification (1 ppb) et 2 ppb.

Les teneurs moyenne et médiane en imidaclopride dans le pollen de trappe de ruche en zone maïs traité GAUCHO sont de respectivement 0,6 et 0,215 ppb. Les dixième et quatre-vingt dixième percentiles de la distribution des teneurs sont respectivement de 0,215 et 1,36 ppb.

Pour le pollen de panicules de maïs non traité GAUCHO, l'ensemble des échantillons analysés (n=5) présente une teneur en imidaclopride inférieure à la limite de détection (0,25 ppb). En revanche pour le pollen de panicules de maïs traité GAUCHO, les teneurs moyenne et médiane en imidaclopride sont respectivement égales à 3,5 et 1,3 ppb. Les dixièmes et quatre-vingt dixièmes percentiles de la distribution des teneurs sont respectivement de 0,625 et 8,5 ppb.

Tableau 2 : Résultats des dosages de l'imidaclopride dans les pollens de trappe et de panicule de maïs (données validées par le CST)

Campagne 2001( Bonmatin, 2002)

Traitements : Bio = Culture Biologique ; Ø = non gauchois ; G = Gauchois ; C = Confidor ; R = Régent

Culture : T = Tournesol ; M = Maïs ; B = Blé ; F = Feveverolle

- : Information non précisée

Code	Type pollen	Année/Traitement/Cultures (variété)						Lieu de prélèvement	Stade	Imidaclopride (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Site	Ident.	Date prélèvement
		A	A-1	A-2											
82 PTM 18/07/01 I-1	M	G	M	G	-	-	-	Trappe	-	ILD	0,43	1	Verdun sur Garonne / Bouillac (82)	-	18/07/01
82 PTM 18/07/01 I-2	M	G	M	G	-	-	-	Trappe	-	ILD	0,43	1	Verdun sur Garonne / Bouillac (82)	-	18/07/01
85 PTM 18/07/01 I-1	M	G	M		-	-	-	Trappe	-	ILD	0,43	1	Auzay / Le Langon (85)	-	24/07/01
49 PTM 11/08/01 I-1	M + ?	G	M + ?	G	M	-	-	Trappe	BCH67	ILD	0,43	1	Gennes (49)	Avort	11/08/01
49 PTM 11/08/01 I-2	M + ?	G	M + ?	G	M	-	-	Trappe	BCH67	ILD	0,43	1	Gennes (49)	Avort	11/08/01
47 PTM 01/08/01 I-1	M	G	M (Naudi)	G	M	-	-	Trappe	30% floraison	ILQ	0,43	1	Verteuil / Brugnac (47)	La Grangeotte	01/08/01
47 PTM 01/08/01 I-2	M	G	M (Naudi)	G	M	-	-	Trappe	30% floraison	ILQ	0,43	1	Verteuil / Brugnac (47)	La Grangeotte	01/08/01
49 PTM 03/08/01 I-1	M	G	M	G	M	-	-	Trappe	BBCH67	1,2	0,43	1	Gennes (49)	Avort	03/08/01
49 PTM 11/08/01 i-3	M + ?	G	M + ?	G	M	-	-	Trappe	BBCH67	2,0	0,43	1	Gennes (49)	Avort	11/08/01
47 PFM 16/08/01 B-1	M	Bio	M	Bio	B	Bio	F	Panicule	60% floraison	ILD	0,25	1	Pujols (47) ; Bio depuis 69	M à n-3	16/08/01
49 PFM 26/07/01 B-1	M	Bio	M	Bio	M	Bio	-	Panicule	BBCH63	ILD	0,25	1	Noyant la Plaine (49) ; Bio depuis 6 ans	-	26/07/01
72 PFM 08/08/01 B-1	M	Ø	M (DK312)	Ø	M	-	-	Panicule	BBCH69	ILD*	0,25	1	Luché-Pringé (72)	-	08/08/01
36 PFM 30/07/01 B-1	M	Ø	M	-	-	-	-	Panicule	BBCH65	ILD	0,25	1	Vildieu (36)	La Beauce	30/07/01
10 PFM 27/07/01 B-1	M	Ø	M	G	M	G	M	Panicule	BBCH65	ILD	0,25	1	Brienne la vieille (Gauchois A-1 à A-6)	Les charmes	27/07/01
85 PFM 24/07/01 I-1	M	G	M (Kussar)	Ø	M	-	-	Panicule	BBCH65	ILQ*	0,25	1	Auzay / Le Langon (85)	St Médard	24/07/01
85 PFM 24/07/01 I-2	M	G	M (Kussar)	Ø	M	-	-	Panicule	BBCH65	ILQ	0,25	1	Auzay / Le Langon (85)	St Médard	24/07/01
72 PFM 08/08/01 I-1	M	G	M (Lexxor)	Ø	M	-	-	Panicule	BBCH65	ILQ	0,25	1	Luché-Pringé (72)	M semences	08/08/01
47 PFM 01/08/01 I-1	M	G	M	G	M	-	-	Panicule	30% floraison	ILQ*	0,25	1	Verteuil / Brugnac (47)	La Grangeotte	01/08/01
47 PFM 01/08/01 I-2	M	G	M (Naudi)	G	M	-	-	Panicule	30% floraison	ILQ*	0,25	1	Verteuil / Brugnac (47)	La Grangeotte	01/08/01

Code	Type pollen	Année/Traitement/Cultures (variété)						Lieu de prélèvement	Stade	Imidaclopride (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Site	Ident.	Date prélèvement
		A		A-1		A-2									
49 FPM 26/07/01 I-1	M	G	M	G	M	-	-	Panicule	BBCH65	ILQ	0,25	1	Gennes (49)	Avort	26/07/01
49 PFM 26/07/01 I-2	M	G	M	G	M	-	-	Panicule	BBCH65	ILQ	0,25	1	Gennes (49)	Avort	26/07/01
85 PFM 24/07/01 I-4	M	G	M			-	-	Panicule	BBCH65	1,9*	0,25	1	Vouillé / Le Langon (85)	Les Marais	24/07/01
85 PFM 24/07/01 I-3	M	G	M			-	-	Panicule	BBCH65	2,8	0,25	1	Vouillé / Le Langon (85)	Les Marais	24/07/01
49 PFM 01/08/01 I-1	M	G	M (anjou37)	∅	B	-	-	Panicule	BBCH65	3,1	0,25	1	Verrie (49)	Beaucheron	01/08/01
72 PFM 08/08/01 I-2	M	G	M (Lexxor)	∅	M	-	-	Panicule	BBCH65	3,2*	0,25	1	Luché-Pringé (72)	-	08/08/01
49 PFM 01/08/01 I-2	M	G	M (Anjou37)	∅	B	-	-	Panicule	BBCH65	4,7	0,25	1	Verrie (49)	Beaucheron	01/08/01
47 PFM 31/07/01 I-2	M	G	M (Asimut)	G	M	G	M	Panicule	-	10,2	0,25	1	Sembas (47)	Nadal	31/07/01
47 PFM 31/07/01 I-1	M	G	M (Asimut)	G	M	G	M	Panicule	-	10,2	0,25	1	Sembas (47)	Nadal	31/07/01

### *I - 3 - Estimation de la dose ingérée*

Une jeune ouvrière adulte consomme environ 60 mg de pollen au total pendant les 10 premiers jours de sa vie. Sur cette base, et sur la base des teneurs en imidaclopride dans les pollens de panicules et de trappe, les quantités théoriques d'imidaclopride consommées par ces abeilles ont été estimées en considérant un régime correspondant à soit 100% de pollen de trappe soit un mélange de pollen comportant du pollen contaminé et du pollen non contaminé en différentes proportions (20, 40 et 60%). La proportion de 20% est déterminé en considérant le rapport imidaclopride dans le pollen panicules et de trappe, rapport conduisant à une dilution d'environ 1/5ème. La proportion de 60 % est rapportée par le syndicat d'apiculture du Lot et Garonne (1998).

Ces calculs sont présentés dans le Tableau 3.

*Tableau 3*

Quantité d'imidaclopride absorbée par les abeilles au bout de 10 jours de consommation (pg)		Concentration d'imidaclopride contenu dans le pollen	
		Trappe	Panicules
		0,6	3,5
Pourcentage de pollen de maïs contaminé par l'imidaclopride	100 %	36	-
	60%	-	126
	40%	-	84
	20%	-	42

## **II - Evaluation des effets**

### *II - 1 - Effets létaux aigus de l'imidaclopride et de ses métabolites sur les abeilles*

Les tests de mortalité ont été effectués d'après les directives OCDE n°213 (toxicité orale) et n°214 (toxicité de contact) et ont donc été réalisés dans des conditions standardisées.

Les études ont été réalisées par la société Bayer, l'INRA d'Avignon et l'INRA de Bures sur Yvette.

Les résultats obtenus par les différents laboratoires sont convergents avec des DL50 orales allant de 4 à 40 ng d'imidaclopride par abeille.

En ce qui concerne les résultats de toxicité topique aiguë, les DL50 de l'imidaclopride varient de 6,7 à 240 ng par abeille.

De grandes variabilités de DL 50 sont observées par un même auteur en fonction de la sous espèce (*Apis mellifera mellifera* vs *mellifera caucasica*).

Deux des métabolites de l'imidaclopride, le 5-hydroxy-imidaclopride et le dérivé oléfine présentent une toxicité orale aiguë pour l'abeille. Les études réalisées par la société Bayer, l'INRA d'Avignon et l'INRA de Bures sur Yvette conduisent à des résultats convergents. La DL50 48h orale du dérivé oléfine est de l'ordre de 30 ng/abeille tandis que celle du 5-hydroxy celle-ci est comprise entre 150 et 250 ng/abeille.

L'étude de la mortalité des abeilles par intoxication aiguë par 4 autres métabolites (les dérivés 4,5-dihydroxylés, guanidine, urée et l'acide 6-chloronicotinique) n'a montré aucune létalité (DL50 > 1000 ng/abeille).

#### ***EN RESUME***

	DL50 48h orale ng/ab	DL50 48h contact ng/ab
Imidaclopride	4 – 40	6,7 – 240
5- hydroxy	150 – 250	-
Oléfine	30	-
4,5 dihydroxy	> 1000	-
Guanidine	> 1000	-
Urée	> 1000	-
6-chloronicotinique	> 1000	-

#### ***II - 2 - Effets létaux chroniques de l'imidaclopride***

Les résultats concernant les effets létaux chroniques de l'imidaclopride proviennent de plusieurs études réalisées à l'INRA de Bures sur Yvette et à l'INRA d'Avignon.

Pour ces études, des abeilles ont été nourries pendant 10 à 11 jours avec du sirop contaminé à l'imidaclopride.

Les études d'Avignon concluent à une DL50 10 jours de 0,1 ppb soit une quantité cumulée ingérée de 0,012 ng par abeille.

Dans les études de Bures, la plus forte dose testée entraîne 20% de mortalité. Elle est de 50 ppb en hiver et 96 ppb en été soit des quantités cumulées de 16 et 35 ng/abeille respectivement. Les doses sans effet sont de 33 ppb en hiver et 48 ppb en été (quantités cumulées 10 et 17 ng/abeille respectivement).

Ces grandes différences observées pourraient s'expliquer par des différences d'âge, d'origine des abeilles et d'anesthésie entre les deux études. Ainsi à Avignon, les abeilles ont été prélevées sur les rayons et correspondent donc à des abeilles d'âge inconnu, tandis qu'à Bures, les abeilles testées correspondent plutôt à de jeunes abeilles se nourrissant de pollen stocké afin de nourrir les larves. Par ailleurs, les abeilles dites d'hiver, issues de ruches chauffées ne correspondent ni à de vraies abeilles d'hiver ni à des abeilles d'été. Les résultats des études d'été seront donc privilégiés.

### ***EN CONCLUSION***

DL50	10 jours	Avignon	0,1 ppb soit 0,012 ng/abeille
DL20	10 jours	Bures	96 ppb soit 35 ng/abeille
NOEC	10 jours	Bures	48 ppb soit 17 ng/abeille

### ***II - 3 - Effets sublétaux de l'imidaclopride et de ses dérivés sur l'abeille***

Ces effets ont été étudiés par l'intermédiaire d'études menées en laboratoire, sous tunnels et cages de vol et en plein champ.

L'ensemble de ces études souffre de grandes insuffisances sur le plan méthodologique. Au niveau de la présentation des rapports d'essais, les points suivants sont à déplorer, un manque de rigueur dans la présentation des résultats obtenus, la pauvreté des représentations graphiques, le fait de ne pas disposer des résultats bruts et le manque de description des tests utilisés et des résultats statistiques.

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

Ainsi sur les 7 études menées en laboratoire concernant les effets sublétaux de l'imidaclopride et de ses métabolites par intoxication orale seule une, à ce jour, répond aux critères de validité retenus par le CST dont certains sont une adaptation à l'évaluation des effets sublétaux des critères de l'OEPP à savoir :

1. Les quantités d'imidaclopride administrées aux abeilles, par voie orale ou par voie topique, doivent être déterminées soit par mesure, soit par calcul.
2. Les abeilles doivent être en bon état physiologique et sanitaire et être maintenues à l'étuve avant l'expérience.
3. Compte-tenu de sa photo-dégradabilité, l'imidaclopride doit être stocké à l'obscurité.
4. Un minimum de 30 abeilles à tester est nécessaire (3 x 10 abeilles par comparaison).
5. En contamination orale, le jeûne préalable des abeilles doit se situer dans un intervalle compris entre 1 et 4 heures.
6. Les fréquences et durées d'exposition doivent être précisées.

Ces études correspondent d'une part à l'évaluation de l'impact de l'imidaclopride sur la prise de nourriture (quantité de sirop ingéré) et d'autre part à l'étude des capacités cognitives (réflexe d'extension du proboscis).

En ce qui concerne la quantité de sirop ingéré, la NOEC est de 48 ppb, soit 1,2 à 1,36 ng/abeille (Pham Delègue et Decourtye, 2000).

Les NOECs réflexe d'extension du proboscis après 11 jours d'exposition sont de 24 ppb (soit 0,6 à 1,68 ng/abeille) pour les abeilles d'hiver et de 6 ppb (soit 0,15 à 0,42 ng /abeille) pour les abeilles d'été (Pham-Delègue et Decourtye 2000). Comme précédemment, les résultats sur abeilles d'été seront privilégiés. Pour les cinq autres études des compléments d'information ont été formulés auprès des équipes concernées avant validation.

En ce qui concerne les études des effets sublétaux par intoxication topique sur les 5 études présentées, quatre répondent aux critères du CST, mais seules trois présentent des NOECs.

Dans ces études, des NOECs de 2,5 ng/abeille (réaction à une stimulation sucrée, Armengaud *et al* 2002) et 10 ng/abeille (réflexe d'extension du proboscis, Decourtye et Pham-Delègue 1998, capacité d'apprentissage, Pham-Delègue et Decourtye 1998 et 1999) ont été déterminées.

Les travaux sous tunnel et cages de vol reposent sur 11 études dont 7 par intoxication sur un nourrisseur et 3 par intoxication sur des tournesols traités GAUCHO. Ne disposant pas d'étude sur le maïs, les études tournesol seront prises en compte

Sur les 7 études « nourrisseurs », une étude (Decourtye et Pham Delègue, 1998) respecte à ce jour les critères de validation retenus par le CST, mais ne permet pas de dégager de NOEC. Ces critères sont les suivants :

1. Les cages de vol doivent être de grande dimension, c'est-à-dire d'un volume minimum de 2 x 2 x3 m.
2. Les ruches expérimentales doivent présenter la plus grande homogénéité génétique et une origine et un développement semblable (minimum de 3 cadres remplis).
3. Pour les études sur nourrisseurs, l'imidaclopride doit être maintenu à l'obscurité.
4. L'évaluation des effets des produits exige que les ruches soient dans des conditions standards (date de la floraison par exemple).
5. Les effets du produit testé doivent être obligatoirement comparés à un témoin traité à l'eau (et éventuellement à un tunnel traité à un produit très toxique).
6. 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 micro-colonies de plusieurs milliers d'abeilles.
7. Les études comportementales doivent comporter plusieurs séries d'observations qui doivent être d'une durée significative.
8. Les études comportementales liées à la capacité des abeilles à retourner à la ruche, au recrutement des butineuses après ingestion d'imidaclopride doivent comporter des distances de vol telles qu'elles représentent les conditions naturelles (plusieurs dizaines voire centaines de mètres).
9. Pour les études sur couvain, il ne doit pas être observé de fonte significative de celui-ci chez les témoins.

Sur les 3 études tunnels « fleur de tournesol », 2 répondent à ces critères, les études de Ambolet *et al.* (1997) et de Tisseur (1998).

La première étude met en évidence une altération de l'activité de butinage (diminution du recrutement) entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour d'observation tandis que l'étude de Tisseur ne met pas en évidence d'altération de l'activité de butinage entre sites témoins et traités.

Enfin 11 études sont disponibles en plein champ. Ces études se répartissent en 3 études sur nourrisseurs et 8 études sur fleurs.

Selon les critères du CST, à savoir :

1. Le champ doit être suffisamment grand pour que les abeilles n'exploitent pas d'autres cultures (plusieurs hectares compte tenu qu'une abeille exploite en moyenne 6,3 km<sup>2</sup>).
2. Les champs témoins et traités doivent être en pleine fleur.
3. Les colonies doivent être placées dans le champ seulement quelques jours avant l'essai.

4. Les colonies doivent être équilibrées (environ 10-12 cadres dont 5-6 de couvain), saines, normales, bien nourries et pour les études sur la colonie comprendre environ 10000-15000 abeilles.
5. Le protocole doit comporter un témoin traité à l'eau.
6. Un minimum de 3 colonies / traitement est nécessaire.
7. Le taux d'exposition des colonies doit être estimé (analyse pollinique par exemple sur le pelage des abeilles et dans les pelotes).
8. Pour les études sur nourrisseurs, l'imidaclopride doit être maintenu à l'obscurité
9. Les études comportementales doivent comporter plusieurs séries d'observation d'une durée significative.

Deux études sont valides (études sur nourrisseurs) (Belzunces *et al.* (1998) ; Belzunces et Suchail, 2001). Dans ces deux études, des comportements anormaux (tremblement du corps, envol difficile, immobilité sur le nourrisseur) ainsi que des altérations de la fréquentation du nourrisseur sont observées dès la concentration de 1000 ppb d'imidaclopride dans le sirop. La concentration sans effet observé est de 100 ppb soit 2,5 à 7 ng/abeille en considérant une consommation de 25 à 70 mg de sirop par abeille. A signaler que la troisième étude (Kirchner, 1999) est en attente de validation, les informations manquantes ne devraient pas conduire à une invalidation de cette étude. Il nous semble raisonnable d'envisager la NOEC la plus basse déterminée au cours de cette étude : danses tremblantes et frétilantes : 10 ppb soit 0,25 à 0,7 ng/abeille.

**EN CONCLUSION**, compte tenu des nombreuses imprécisions sur les protocoles, très peu d'études sont finalement exploitables. Les NOECs, réflexe d'extension du proboscis et quantité de sirop ingéré sont dans des études au laboratoire de respectivement 0,15 à 0,4 ng/abeille et 1,2 à 3,5 ng/abeille, tandis que la NOEC plein champ nourrisseur comportement est de 2,5 à 7 ng/abeille.

#### ***II - 4 - Conclusions générales des études de toxicité***

Mortalité aiguë	DL50 orale 48h	4 à 40 ng/abeille
Mortalité chronique	DL50 orale 10 jours	0,012 ng/abeille (Avignon)
	DL20 orale 10 jours	35 ng/abeille (Bures)
	NOEC orale 10 jours	17 ng/abeille (Bures)
Effets sublétaux	Laboratoire Extension proboscis	NOEC 0,15 à 0,4 ng/abeille
	Laboratoire Quantité de sirop ingérée	NOEC 1,2 à 3,5 ng/abeille

### III - Evaluation des dangers

#### III - 1 - Méthodologie

Pour évaluer les dangers liés à l'utilisation de l'imidaclopride en enrobage de semence maïs deux approches seront utilisées.

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*. 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.

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*<sup>1</sup> 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> ou NOEC par un facteur d'incertitude. Ces facteurs ont été établis pour représenter les incertitudes suivantes :

- 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 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 4.

Tableau 4 : Facteurs d'incertitude pour le calcul d'une PNEC<sub>terrestre</sub>

---

<sup>1</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.

<b>Information disponible</b>	<b>Facteur d'incertitude</b>
L(E)C <sub>50</sub> de tests de toxicité à court-terme (par ex. plantes, vers de terre, ou micro-organismes)	1000
NOEC pour un essai long-terme (par ex. plantes)	100
NOEC pour des essais long-terme sur des espèces représentant 2 niveaux trophiques	50
NOEC pour des essais long-terme sur des espèces représentant 3 niveaux trophiques	10
Données en plein champ	Cas par cas

Dans notre cas, la valeur de la PNEC sera évaluée à partir, soit des données d'intoxication aiguë dont nous disposons, soit des données d'intoxication chronique, en lui associant le facteur d'incertitude qui nous semblera le plus approprié.

Dans le cas de l'évaluation des risques liés à l'utilisation des phytosanitaires, il n'est pas à proprement déterminé de concentration prévisible sans effet. Ainsi le risque est évalué pour chaque entité taxonomique par le rapport entre un indice de toxicité (CL50 ou NOEC) et la concentration prédite d'exposition. Dans ce cas un risque sera identifié si la valeur de ce rapport est inférieure à une valeur seuil qui dépend de la nature des données de toxicité disponible, CL50 ou NOEC. Cette valeur seuil peut donc être assimilée au facteur d'incertitude utilisé pour la détermination de la PNEC dans le cas des substances chimiques et pour la clarté de la démarche il est proposé dans la suite de l'évaluation de déterminer une PNEC en appliquant ces valeurs seuil aux indices d'écotoxicité.

Dans le cas de l'évaluation des risques pour les abeilles les données d'écotoxicité classiquement disponibles concernent la toxicité aiguë par contact ou ingestion. La valeur seuil retenue pour l'évaluation des risques est de 50 (directive 97/57). La PNEC sera donc obtenue en divisant la DL50 contact ou ingestion par 50.

Cette différence de valeur entre les approches substances chimiques et phytosanitaires s'explique par une différence d'objectif pour les PNEC, protection de l'ensemble des espèces d'un écosystème dans le premier cas, protection d'une seule entité taxonomique, les abeilles, dans le second cas.

En ce qui concerne l'évaluation des risques à partir des données de toxicité chronique aucune valeur seuil n'est proposée dans les documents guides phytosanitaires pour les abeilles. Le facteur d'incertitude sera donc déterminé au cas par cas en fonction du nombre et de la nature des données disponibles.

### ***III - 2 - Evaluation des dangers à partir des données de toxicité aiguë***

A ce stade, 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 orale de l'imidaclopride est comprise dans la fourchette 4-40 ng/abeille. La valeur la plus basse de cet intervalle sera utilisée pour le calcul de la concentration prévisible sans effet.

Dans le cas de l'approche substances chimiques et conformément au tableau 4, le facteur d'incertitude devrait être de 1000. Toutefois, la toxicité aiguë de l'imidaclopride ayant été évaluée dans de nombreux essais dont les résultats convergent (différents laboratoires, différentes races), il nous semble possible d'utiliser lors d'une première évaluation un facteur de 100.

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

Dans le cas de l'approche phytosanitaire le facteur d'incertitude est de 50 ce qui conduit en première évaluation à une PNEC de :

$$PNEC = 4/50 = 0,08 \text{ ng} = 80 \text{ pg/ab.}$$

Cependant dans la mesure où l'on dispose de données de toxicité subchronique et sublétale, ces évaluations pour lesquelles il existe un fort degré d'incertitude n'apparaissent pas pertinentes pour une évaluation toxicologique par intoxication chronique et ne seront donc pas utilisées pour l'évaluation des dangers liés à une exposition chronique

### ***III - 3 - Evaluation des dangers à partir des données de mortalité 10 jours***

La concentration prévisible sans effet est évaluée sur la base des données de mortalité orale 10 jours, soit la DL50 10 jours orale de 0,012 ng/abeille dans les études d'Avignon et la NOEC orale 10 jours de 17 ng/abeille dans les études de Bures-sur-Yvette.

Pour l'estimation de la PNEC à partir de la DL 50, un facteur d'incertitude de 50 pourrait donc être utilisé. Dans la mesure où la DL 50 est obtenue sur une sous-espèce particulièrement sensible, il est possible de ramener ce facteur à une valeur de 10.

A partir de la NOEC orale 10 jours, un facteur d'incertitude de 10 est utilisé pour déterminer la PNEC.

L'application de ce facteur d'incertitude de 10 conduit à des PNEC de respectivement 1,2 pg/abeille et 1,7 ng/abeille.

### *III - 4 - Evaluation des dangers à partir des études de toxicité sublétales*

Trois types d'études sont disponibles, des études de laboratoire concernant le réflexe d'extension du proboscis pour lesquels la NOEC est de 0,15 à 0,4 ng/abeille, des études en tunnel correspondant à une LOEC de 0,25 à 0,7 ng/abeille et des études plein champ pour lesquelles des NOECs de 0,25 à 0,7 ng/abeilles et 2,5 à 7 ng/abeille ont pu être dérivées.

Dans le cas de l'étude de laboratoire et sous tunnel, un facteur d'incertitude de 10 est retenu ce qui conduit à des PNECs de respectivement 15 à 40 pg/abeille et 25 à 70 pg/abeille.

En ce qui concerne les études plein champ, un facteur d'extrapolation plus faible (5) peut être utilisé compte tenu de la plus grande représentativité de ces études par rapport aux études de laboratoire. Ceci conduit à des PNECs de 0,05 à 0,14 et 0,5 à 1,4 ng/abeille selon que l'on prenne en compte ou non l'étude de Kirchner.

### III - 5 - Récapitulatif

Toxicité		Facteur d'incertitude	PNEC
Mortalité court terme	DL50 orale = 4 ng/ab	100 (sub. Chimiques) 50 (phytosanitaires)	40 pg/ab 80 pg/ab
Mortalité chronique	DL50 = 0,012 ng/ab NOEC = 17 ng/ab	10 (50 → 10) 10	1,2 pg/ab à 1,7 ng/ab
<b>Toxicité sublétales</b>			
labo proboscis	NOEC = 0,15 à 0,40 ng/ab	10	15 à 40 pg/ab
tunnel	LOEC 0,25 à 0,7 ng/ab	10	25 à 70 pg/ab
Plein Champ <sup>2</sup>	NOECs 2,5 à 7 ng/ab	5	0,5 à 1,4 ng/ab

#### IV Evaluation des risques

Les risques sont évalués par le rapport entre la concentration d'exposition et la concentration prévisible sans effet pour les abeilles.

Un rapport supérieur à 1 traduira un risque théorique possible pour les abeilles, tandis qu'un rapport inférieur à 1 pourra être considéré comme indiquant un risque non préoccupant.

Les calculs sont réalisés à partir de diverses proportions de pollen contaminé dans le régime et à partir des différentes concentrations prévisibles déterminées à partir des différents essais d'écotoxicité. La valeur de PNEC correspondant à une hypothèse dite "de pire cas" est utilisée dans l'évaluation.

Les résultats sont présentés dans le tableau 5 :

<sup>2</sup> Etude Kirchner (M14) en cours de validation : NOEC = 0,25 à 0,7 ng/ab → PNEC = 0,05 à 0,14 ng/ab

*Tableau 5.1. : Indices de risques calculés à partir des concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé - évaluation réalisée à partir des données de toxicité chronique en laboratoire*

	Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé (en pg)			
Concentration prévisible sans effet (PNEC en pg/ab)	36 (100 % pollen de trappe)	42 (20 % pollen de panicule)	84 (40 % pollen de panicule)	126 (60 % pollen de panicule)
<b>1,2</b>	30	35	70	105
<b>1700</b>	0,02	0,02	0,05	0,07

Les indices de risque déterminés à partir des données mortalité 10 jours de l'INRA d'Avignon apparaissent, en première analyse, préoccupants. Dans ces conditions, en suivant la procédure habituellement utilisée pour l'évaluation des risques environnementaux liés aux substances chimiques, il est nécessaire d'affiner l'évaluation des risques en prenant en compte des données plus représentatives des conditions naturelles, soit des données sublétales laboratoire soit des données terrains.

Tableau 5.2. : Indices de risques calculés à partir des concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé - évaluation réalisée à partir des données de toxicité sub létale en laboratoire

	Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé (en pg)			
Concentration prévisible sans effet (PNEC en pg/ab)	36 (100 % pollen de trappe)	42 (20 % pollen de panicule)	84 (40 % pollen de panicule)	126 (60 % pollen de panicule)
<b>15</b>	2,4	2,8	5,6	8,4

Les indices de risques calculés à partir des données de toxicité sub létale laboratoire apparaissent comme étant moins préoccupants tout en restant supérieur à 1. Il convient donc de poursuivre la procédure.

Tableau 5.3. : Indices de risques calculés à partir des concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé - évaluation réalisée à partir des données de toxicité sub létale en tunnel

	Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé (en pg)			
Concentration prévisible sans effet (PNEC en pg/ab)	36 (100 % pollen de trappe)	42 (20 % pollen de panicule)	84 (40 % pollen de panicule)	126 (60 % pollen de panicule)
<b>25</b>	1,4	1,7	3,4	5,0

A partir des données tunnels, le risque calculé demeure supérieur à 1 ce qui implique de poursuivre la procédure jusqu'aux études plein champs.

Tableau 5.4. : Indices de risques calculés à partir des concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé - évaluation réalisée à partir des données de toxicité sub létale en plein champs

	Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenu dans le pollen contaminé (en pg)			
Concentration prévisible sans effet (PNEC en pg/ab)	36 (100 % pollen de trappe)	42 (20 % pollen de panicule)	84 (40 % pollen de panicule)	126 (60 % pollen de panicule)
<b>500</b>	0,07	0,08	0,17	0,25

Même en considérant la plus faible des valeurs des PNECs déterminées à partir des données de terrain, les indices de risques sont largement inférieurs à 1, ce qui conduit à relativiser les valeurs alarmantes déterminées à partir des essais de laboratoire. Il est à prendre en considération le fait qu'un certain nombre d'études restent en examen avant validation et en particulier l'étude de terrain de Kirchner qui conduit à des indices de risque dix fois plus élevés que ceux actuellement déterminés à partir des études plein champs de Belzunces et al. (1998 et 2001).

### ***V Conclusions***

L'exposition la plus réaliste (puisque correspondant au pollen réellement consommé par les abeilles) utilisant les dosages obtenus sur pollen de trappe prélevé dans des zones de maïs traité Gaucho, ne démontre pas de risque même en prenant les doses sans effet les plus basses des études plein champs affectées d'un facteur d'incertitude.

Cependant, dans certaines conditions particulières d'évaluation de l'exposition et des dangers (montrées dans une étude plein champs pour des hypothèses de pourcentage de pollen de panicule contaminé de 40 et 60% dans le régime alimentaire), l'imidaclopride est susceptible de présenter un niveau de risque significatif sur le comportement des abeilles.

L'évaluation du risque réalisée ne permet donc pas de démontrer que le traitement de semences de maïs par la préparation Gaucho puisse être seul responsable au niveau national de l'ensemble des dépopulations de ruches, des troubles comportementaux, des mortalités d'abeilles et plus globalement de la baisse de la production apicole.