Reactie op Internetconsultatie Regeling gewasbeschermingsmiddelen en biociden

Dr. Jeroen P. van der Sluijs
Copernicus Instituut voor Duurzame Ontwikkeling en Innovatie, Universiteit Utrecht, Heidelberglaan 2, 3584 CH Utrecht. E-mail: j.p.vandersluijs@uu.nl Tel: 030-2537631

Datum: 4 augustus 2009

Vraag 1 Zijn de aan te wijzen beoordelingsmethoden actueel?

Nee. De beoordelingsmethoden voldoen niet voor systemische insecticiden omdat die specifieke eigenschappen hebben, in het bijzonder de chronische subletale effecten van deze stoffen en hun metabolieten op honingbijen en andere bestuivers (hommels, wilde bijen e.d.), die dringend om een andere beoordelingsmethode vragen.

In het bijzonder voor systemische neonicotinoide insecticiden (met werkzame stoffen zoals imidacloprid, thiametoxam en chlotianidine) dient de beoordeling niet alleen van de Hazard Quotient uit te gaan maar dient deze gebaseerd te zijn op een vergelijking van de blootstelling (Predicted Exposure Concentration) en de toxiciteit (Predicted No Effect Concentration) voor verschillende functionele categorieën van honingbijen in een bijenvolk op basis van hun pollen consumptie, nectar consumptie en overige blootstellingsroutes (waaronder de route via rechtstreeks fourageren op oppervlaktewater dat vervuild is met gewasbeschermingsmiddelen en biociden).

Deze aanpak is reeds voorgesteld door de CST 2003 studie (http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/rapportfin.pdf), en is later verder uitgewerkt door Halm et al., 2006 (http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es051392i) en is ook aanbevolen door Maxim en Van der Sluijs 2007 (http://www.bijensterfte.nl/sites/default/files/maxim_and_vanderSluijs2007.pdf).

De methode zoals voorgesteld in Halm et al. 2006 (bijgevoegd) dient te worden toegevoegd aan de lijst met aan te wijzen richtsnoeren en nationale beoordelingsmethoden.

De beoordelingsmethoden moeten verder beter naar de effecten van chronische blootstelling op bijenvolken kijken waarbij het blootgestelde volk als een superorganisme dient te worden beschouwd. Voorts dienen de beoordelingsmethoden zodanig te worden uitgebreid dat ook naar mogelijke synergie effecten van simultane blootstelling aan meerdere gewasbeschermingsmiddelen en hun metabolieten wordt gekeken.

Ook verzuimen de huidige beoordelingsmethoden de effecten in kaart te brengen, en de aanvaardbaarheid daarvan te toetsen, die chronische (jaarrond) blootstelling heeft op de vatbaarheid van bijenkolonies voor ziekten en plagen. De voorgestelde lijst met aan te wijzen beoordelingsmethoden is ook op die punten niet actueel en niet toereikend. Het gevolg is dat de bescherming van bijenvolken met de toepassing van deze methoden niet is gegarandeerd.

Verder ontbreekt er in de huidige regelgeving een mogelijkheid om de toelating in te trekken wanneer concentraties van de werkzame stoffen en hun metabolieten in het milieu de

Maximaal Toelaatbare Risiconiveaus (MTR) overschrijden. Dit is een groot manco van de huidige regelgeving. Al enkele jaren zijn er zeer grote normoverschrijdingen van imidacloprid in het Nederlandse oppervlaktewater in ondermeer Zuid Holland en Flevoland. Omdat deze stof systemisch is nemen wilde bloeiden planten deze op uit het oppervlaktewater waardoor onvoorziene en ongemonitorde blootstellingsroutes ontstaan die mogelijk verband houden met de zeer hoge waargenomen bijenvolksterfte in die zelfde gebieden. Zie ook: http://www.bijensterfte.nl/nl/node/21

Omdat de handhaving van MTR normen in oppervlaktewater momenteel kennelijk faalt, dient het handhavingsinstrumentarium terstond te worden uitgebreid met de mogelijkheid de toelating (al dan niet tijdelijk) in te trekken in gebieden waar niet aan de MTR norm is voldaan. Deze mogelijkheid moet worden toegevoegd aan de nieuwe regeling gewasbeschermingsmiddelen en biociden. Dit zal toepassers van gewasbeschermingsmiddelen ook zorgvuldiger maken bij de toepassing omdat bijvoorbeeld het lozen van spuiwater uit kassen hen dan rechstreeks in hun belang raakt: immers als ze teveel in het milieu laten komen mogen zij (en omliggende toepassers) het middel niet meer toepassen. Dit zal naar mijn verwachting ook ten goede komen aan de zelfregulatie en het zelftoezicht binnen de sector op elkaar.

Vraag 2 Zijn de aan te wijzen beoordelingsmethoden algemeen wetenschappelijk aanvaard?

Nee. Diverse wetenschappers hebben gewezen op de tekortkomingen zoals ik die onder mijn antwoord op vraag 1 heb toegelicht.

Vraag 3 Zijn de aan te wijzen beoordelingsmethoden voldoende bekend of kenbaar?

Gedeeltelijk. Het zou helpen wanneer er een webpagina zou worden ingericht waarop alle documenten waarin elk van de richtsnoeren en nationale beoordelingsmethoden zijn beschreven, zijn te downloaden. Het feit dat alleen een lijst is verstrekt ten behoeve van de internetconsultatie en geen links naar de volledige documenten bemoeilijkt het goed becommentariëren van deze methoden en richtsnoeren.

Bijlagen:
De volgende bijlagen maken integraal deel uit van deze reactie:

Halm, M.P., Rortais, A., Arnold, G., Taséi, J.N. and Rault, S. 2006. A new risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honeybees and imidacloprid (Gaucho®). Environmental Science & Technology 40:2448–54.

CST (Comité scientifique et technique de l’étude multifactorielle des troubles des abeilles), 2003. Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho®) et troubles des abeilles, rapport final, 106 pp., http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/rapportfin.pdf

Maxim L. and Van der Sluijs, J.P., 2007. Uncertainty: cause or effect of stakeholders’ debates? Analysis of a case study: the risk for honey bees of the insecticide Gaucho®, Science of the Total Environment, 376, 1 -17.

Bijensterfte.nl, 2009. Imidacloprid in alarmerende hoeveelheden in het Nederlandse oppervlaktewater, http://www.bijensterfte.nl/nl/node/21

Environ. Sci. Technol. **2006**, *40,* 2448−2454

New Risk Assessment Approach for Systemic Insecticides: The Case of Honey Bees and Imidacloprid (Gaucho)

MARIE-PIERRE HALM,*,† A. RORTAIS,*,‡ G. ARNOLD,‡ J. N. TASÉI,§ AND S. RAULT†

Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie, 5 rue Vaubenard, 14032 Caen cedex, France, Laboratoire Evolution, Génomes, Spéciation, CNRS-UPR9034, Bâtiment 13, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, France, and Laboratoire de Zoologie, INRA, 86600 Lusignan, France

The procedure to assess the risk posed by systemic insecticides to honey bees follows the European Directives and depends on the determination of the Hazard Quotient (HQ), though this parameter is not adapted to these molecules. This paper describes a new approach to assess more specifically the risk posed by systemic insecticides to honey bees with the example of imidacloprid (Gaucho). This approach is based on the new and existing chemical substances Directive in which levels of exposure (PEC, Predicted Exposure Concentration) and toxicity (PNEC, Predicted No Effect Concentration) are compared. PECs are determined for different categories of honey bees in relation to the amounts of contaminated pollen and nectar they might consume. PNECs are calculated from data on acute, chronic, and sublethal toxicities of imidacloprid to honey bees, to which selected assessment factors are applied. Results highlight a risk for all categories of honey bees, in particular for hive bees. These data are discussed in the light of field observations made on honey bee mortalities and disappearances. New perspectives are given to better determine the risk posed by systemic insecticides to honey bees.

Introduction

In the European Union, formulated pesticides are registered by the European Council Directive (EC-91/414) and the risk posed by these molecules to honey bees is directly assessed by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) guidelines No. 170 (*1*). These guidelines propose methods for evaluating side effects of agrochemical products on honey bees. The approach is based on a 3 tier assessment scheme comprising early studies in laboratory conditions, followed by semi-field studies, and completed by field studies. According to this Directive, and to the decision making scheme attached to the EPPO guidelines (*2*), moving from tier 1 (laboratory studies) to tier 2 (semi-field studies) depends on a trigger criterion, the Hazard Quotient (HQ = field application rate/oral or contact Lethal Dose (LD_{50})). When the calculated value of HQ is higher than a threshold of 50, further studies are required. This threshold is derived from data which only consider spray applications on honey bees (*3*).

In the case of plants treated by systemic insecticides, honey bees may be at risk via contaminated pollen and nectar (*4*). The contamination of nectar by sprayed systemic insecticides has been long documented (*5*), whereas little information is available on systemic formulations applied in soils and on seeds. Published data deal mainly with aldicarb, a carbamate substance used for the protection of various cultures (*6*). More recently, several authors supplied data on the presence of imidacloprid, a neonicotinoid systemic insecticide, in nectar and pollen of treated plants (*7*).

Generally, systemic insecticides provide the treated plant with a permanent protection from soil invertebrates and sucking insects (*8*). Applied in soils and on seeds, they degrade slowly over time and disperse in all the plant tissues during its growth. Therefore, using the field application rate of active substance as an exposure parameter to assess the risk posed by systemic insecticides to honey bees is not sensible. Unlike sprayed insecticides, which have a short-lasting action on plants, systemic insecticides are persistent. Moreover, these molecules, detected at low concentrations in the pollen and nectar of treated plants, are more likely to affect honey bees by acute, chronic, and sublethal intoxications (*9*) rather than by acute intoxications alone.

In this paper, we propose a new approach to determine the risk posed by systemic insecticides to honey bees. It is based on the European Technical Guidance Directive (TGD) that assesses the impact of new (793/93 and 1488/94/CE legislations) and existing chemical substances (EC-67/54/8 and EEC-93/67 Directives) on ecosystems (*10*). This approach is applied to imidacloprid, which is a good study case because it has been extensively studied and presents a lot of experimental data.

Materials and Methods

A group of experts, namely the Scientific and Technical Committee (CST), was nominated in 2001 by the French Ministry of Agriculture to assess the risk posed by imidacloprid to honey bees. This committee examined all studies, delivered up to July 2004 by the Ministry of Agriculture, on the toxicity of imidacloprid to honey bees (*7*). This paper refers to some of the work achieved by this committee.

For many wildlife species, the standard practice in pesticide regulation (91/414 EEC) is to determine a toxicity exposure ratio (TER) and to compare it to a threshold (a safety factor) that aims at protecting these species. In this paper, we used the PEC/PNEC ratio (predicted environmental concentration/predicted no effect concentration) which aims at protecting ecosystems (*10*). Honey bees (unlike most other species) live in colonies and depend on each other for survival. Such interdependent relationships define the honey bees' colony as a superorganism (*11*). The functioning of a superorganism is similar to that of an ecosystem in the sense that each unit (temporal castes in a colony and species in an ecosystem) is essential to sustain the system as a whole (*12*). Moreover, considering their role as pollinators (*13*), honey bees represent a good model to assess the risk of insecticides to pollinators and to protect many plant species that rely on these organisms, through pollination, to reproduce.

According to the PEC/PNEC approach and with the example of imidacloprid, we determined PECs with the

* Corresponding authors. Phone: (33/0) 2 31 56 59 10 (M.-P.H.), (33/0-1) 69 82 37 17 (A.R.); fax: (33/0) 2 31 93 11 88 (M.-P.H.), (33/0-1) 69 82 37 36 (A.R.); e- mail: MHalm@cermn.unicaen.fr or Rotrais@pge.cnrs-gif.fr.

† Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie.

‡ Laboratoire Evolution, Génomes, Spéciation, CNRS.

§ Laboratoire de Zoologie, INRA.

10.1021/es051392i CCC: $33.50 © 2006 American Chemical Society
Published on Web 03/07/2006

TABLE 1. Estimated PECs for Different Categories of Honey Bees to Imidacloprid[a]

categories of bees	sugar[b]	pollen[b]	imidacloprid (20%)	imidacloprid (40%)	imidacloprid (60%)	imidacloprid (80%)	imidacloprid (100%)
worker larvae ($d = 5$)	59	5	41	82	124	165	206
drone larvae ($d = 6.5$)	98	N. A.[c]	63	126	189	252	315
nurses ($d = 10$ for pollen and $d = 8$ for nectar)	272−400	65	219−301	438−602	656−903	875−1204	1094−1505
wax-producing bees ($d = 6$)	108		69	139	208	278	347
winter bees ($d = 90$)	792		509	1017	1526	2034	2543
nectar foragers ($d = 7$)	224−899		144−577	288−1155	431−1732	575−2310	719−2887
pollen foragers ($d = 7$)	73−109		47−70	94−140	140−210	187−280	234−350

[a] Estimated amounts of food (sugar and pollen in mg) and imidacloprid (in pg) consumed per bee over *d* days, with different levels of food contamination (%). [b] Data from ref *21*. [c] N. A.: No available data.

known concentrations of imidacloprid found in the contaminated pollens (sunflower and maize) and nectar (sunflower) consumed by honey bees, and we determined PNECs with the data derived from studies on acute, chronic, and sublethal toxicities of imidacloprid to honeybees.

Criteria for the Validation of Data. To determine the concentration of imidacloprid in pollens and nectar issued from imidacloprid seed-dressed plants and the honey bees' exposure to imidacloprid, the CST validated the data of all the studies that met the following requirements in terms of sampling procedure, chemical analyses, and toxicity testing.

For the sampling procedure, studies needed to describe thoroughly the methods used (sampling location, pesticide treatments history) and gather sufficient samples, both qualitatively and quantitatively. Qualitatively, data obtained from pollens collected directly on anthers of treated flowers, rather than in pollen traps, were kept and validated because the concentration of imidacloprid in pollens of traps is highly variable and depends on the environment (i.e., the amount of plants treated by systemic insecticides) (*14*). Quantitatively, the CST retained the value of a minimum of 10 samples to enable statistics (means and standard deviations). Samples coming from different experiments and locations, but presenting similar protocols, were grouped together to get a minimum of 10 samples.

For the chemical analyses, given the high toxicity of imidacloprid, we validated studies that detected the molecule the most accurately as possible, that is by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) (*15*) and using an appropriate limit of quantification (LOQ = 1 μg/kg), limit of detection (LOD < 0.5μg/kg), and sample weight (10 g). The only study that used a radioactivity method coupled with thin-layer chromatography (TLC) and automated multiple development (AMD) techniques (*16*) was validated too because it allowed a clear identification of imidacloprid, unlike less specific methods such as the derivation and gas chromatography (GC) (*17*, *18*).

To determine the toxicity of imidacloprid to honey bees, studies apply standardized tests designed by the OECD guidelines (*19*, *20*). Such tests are developed in laboratory conditions to assess oral (*19*) and topical (*20*) acute toxicities of pesticides (and other chemicals) to adult worker honey bees. These laboratory tests follow the EPPO guidelines No. 170 (*1*) and the recommendations made by the International Commission for Plant−Bee Relationships (ICPBR). While these guidelines propose methods to test oral and topical acute toxicities, there are currently no standardized tests to study chronic and sublethal toxicities of pesticides to honey bees. Nevertheless, a few studies have investigated the impact of imidacloprid on honey bees by chronic and sublethal intoxications in laboratory, semi-field, and field conditions. To assess these studies, we referred to the EPPO guidelines because they present guidelines for semi-field and field experiments (*1*).

PEC Estimates. By definition, a PEC corresponds to the amount of pesticides a honey bee might be exposed to, either by ingestion or contact. In this paper, with the example of imidacloprid and honey bees, we only considered oral exposures because data on topical exposures are scant.

We can estimate honey bees' exposure to both contaminated pollens (sunflower and maize) and nectar (sunflower) with (*i*) the known and validated concentrations of imidacloprid found in contaminated pollens and nectars, and (*ii*) the amount of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of honey bees (*21*).

(*i*) The amount of imidacloprid present in the food of honey bees is directly related to the environement. For example, if a hive is located near extensive cultures of maize and sunflower plants treated by imidacloprid, the proportions of pollen and/or nectar that might be contaminated by imidacloprid are expected to be high. Since the relative proportions of contaminated food, versus uncontaminated food, consumed by honey bees are unknown, we considered 5 different levels of contamination ranging from 20% (a low level of contamination) to 100% (the highest level of contamination) (Table 1), although the latter case might rarely occur in natural conditions.

(*ii*) The amount of contaminated food consumed by different categories of honey bees depends on the amount of food the bees require to achieve particular tasks within the colony. Among them, Rortais et al. (*21*) considered the categories that are potentially the most exposed to imidacloprid: those that achieve the most costly tasks in terms of energy and which consume the highest amounts of pollen for their development. Therefore, for the calculation of the PEC, the following categories of honey bees were considered: the worker larvae which consume pollen and nectar for their development over about 5 days; the drone larvae which consume pollen and nectar for their development over about 6.5 days; the nurses which consume pollen over a period of 10 days and nectar and/or honey to maintain the nest temperature at 34 °C over the entire brood attendance period, lasting about 8 days; the wax-producing bees which consume nectar during the period of maximum wax production, lasting about 6 days; the winter bees which consume nectar and honey to maintain the nest temperature at viable

temperature during winter, lasting about 90 days in temperate regions; and the nectar and pollen foragers which consume nectar and/or honey to cover their daily flight expenses. As a forager life span is highly variable (between 1 and 3 weeks), the amount of food consumed by a forager to collect food has been estimated over a minimal period of one week.

Honey Bees' Exposure to Contaminated Sunflower and/or Maize Pollens. The honey bee's exposure to contaminated pollens collected on treated plants is determined by the following equation:

$$PEC_1\ (pg) = \text{Validated concentration of imidacloprid found in sunflower and/or maize pollens } (\mu g/kg) \times \text{Amount of pollens consumed by honey bees (mg)} \times \text{Levels of contamination found in pollen (\%)}$$

Honey Bees' Exposure to Contaminated Sunflower Nectar. The nectar brought back to the colony is consumed by honey bees, either rapidly as it is or later on as honey when it is stored. The relative amounts of nectar and honey consumed by honey bees are unknown. However, the amounts of sugar contained in sunflower honey and nectar are known and are, on average, 80% and 59%, respectively (*22*, *23*). Therefore, the amounts of sunflower nectar and/or honey consumed by honey bees can be determined by their sugar consumption, in relation to their energy requirement (*21*). As a result, for every milligram of sugar required, a honey bee will have to consume 1.25 mg of sunflower honey or 1.69 mg of sunflower nectar. Therefore, a honey bee's exposure to contaminated sunflower nectar can be determined by the following equation:

$$PEC_2\ (pg) = \text{Validated concentration of imidacloprid found in sunflower nectar } (\mu g/kg) \times \text{Amount of sugar consumed by honey bees (mg)} \times 1.69\ \text{Levels of contamination found in sunflower nectar (\%)}$$

Honey Bees' Exposure to Contaminated Sunflower and/or Maize Pollens and to Contaminated Sunflower Nectar. The honey bee's exposure to contaminated sunflower and/or maize pollens and to contaminated sunflower nectar is summarized as follows:

$$PEC\ (pg) = PEC_1\ (pg) + PEC_2\ (pg)$$

PNEC Estimates. By definition, a PNEC corresponds to the amount of substances that will have no impact on ecosystems. For numerous substances, the pool of data is usually too limited to predict their effects on ecosystems. In such circumstances, empirically derived assessment factors must be applied. These assessment factors allow the prediction of a concentration below which an unacceptable effect will most likely not occur. The size of these assessment factors incorporates various uncertainties due to extrapolations from single-species laboratory data to a multi-species ecosystem, in particular uncertainties due to intra- and inter-laboratory variations in toxicity data, intra- and inter-species variations, short-term to long-term toxicity extrapolations, and from laboratory data to field impact studies. For the terrestrial compartment, the size of the assessment factors depends on the confidence we have on the representativeness of the toxicity data. For example, the size of these factors is reduced when more data become available at various trophic levels and for several taxonomic groups.

Based on these parameters and in relation to the experimental conditions, the TGD determines various assessment factors. In laboratory conditions, for short-term toxicity tests (LD_{50}) and for one trophic level, a factor 1000 is used, for long-term toxicity tests and for several trophic levels with known NOEC, a factor 100 is applied, and for additional long-term toxicity tests of two or three trophic levels of known NOEC, the factors 50 and 10, respectively, are selected. In field conditions, an assessment factor is determined case by case (*10*).

The approach presented in this paper consisted in finding appropriate PNECs for honey bees derived from PNECs designed for ecosystems. These PNEC values were estimated with the available data obtained from studies on oral acute, chronic, and sublethal toxicities of imidacloprid to honey bees. These values were derived from the lowest validated toxicities (LD_{50}, lowest observed effect concentration (LOEC), or no observed effect concentration (NOEC)) to which assessment factors are applied. This new approach is specifically adapted to honey bees because it allows the assessment of both colonies and individuals. These factors had to be determined case by case, following the standard approach used by the TGD. Every time new data enabled us to reduce extrapolations (chronic toxicity data in relation to acute toxicity data), the assessment factors were generally reduced by a factor 10.

PEC/PNEC Estimates. The hazard posed by new substances to organisms is determined by the PEC/PNEC ratio. When this ratio is over 1, it highlights an intoxication risk for honey bees, whereas when it is below 1, it indicates no risk. According to the TGD (*10*), this ratio is obtained and derived from acute toxicity data, but when a risk is found, the ratio is re-calibrated with new data obtained in more representative conditions. For honey bees, the PECs were determined with all the available scientific data found on honey bees' food consumptions because there were sufficient data, whereas the PNECs required more data. Therefore, following the TGD procedure, PNECs were derived from acute toxicity data. When a risk was highlighted, a new PEC/PNEC ratio was determined with data obtained from chronic toxicity studies. If the new ratio remained over 1, a final PEC/PNEC ratio was then calculated with new data coming from sublethal field toxicity studies. This final ratio is the most representative ratio of the natural conditions of a honey bees' colony.

Results

PEC Estimates. (*i*) In pollen collected directly on the anthers of flowers, the concentrations of imidacloprid found in treated sunflower and maize plants are 3.3 and 3.5 μg/kg, respectively (*24*, *25*), or on average 3.4 μg/kg for both pollen types. The concentration of imidacloprid found in treated sunflower nectar is 1.9 μg/kg (*25*). (*ii*) Based on the estimated amounts of pollen and nectar consumed by honey bees over several days of activity (*21*), the potential amounts of imidacloprid ingested by honey bees were determined (Table 1).

PNEC Estimates. There is currently no test and no toxicity data for larvae. For this category of honey bees, PNECs were derived from the toxicity data obtained in adult workers. Table 2 shows the PNECs determined in adults and derived from acute, chronic, and sublethal toxicity data, to which specific assessment factors were applied.

From acute toxicity data: the lowest validated LD_{50} (48 h) is 3.7 ng of imidacloprid per bee (*26*). According to the TGD (*10*), the assessment factor for acute toxicity data is 1000. However, the toxicity of imidacloprid was determined by several studies which tested models belonging to the same species, and found similar results. As these data present very few uncertainties, an assessment factor of 100 was applied. Therefore, the validated PNEC becomes 3.7/100 = 37 pg/bee.

From Chronic Toxicity Data. In laboratory conditions, the lowest validated value was LD_{50} (10 d) = 0.012 ng/bee (*27*). As this value was obtained from a long-term experiment, it seemed appropriate to apply the same assessment factor as the one used for a long-term NOEC experiment, which is 100 (*10*). However, this factor is used to determine a PNEC for

TABLE 2. PNECs for Oral intoxications of Honey Bees to Imidacloprid

toxicities	experimental conditions (imidacloprid intakes)	doses (ng/bee)	observed variables	assessment factors	PNEC (pg/bee)
acute	laboratory (one determined dose)	LD_{50} (48 h) = 3.7	survival (% mortality)	100	37
chronic	laboratory+ (one determined dose)	LD_{50} (10 d) = 0.012	survival (% mortality)	10	1.2
sublethal	laboratory (one determined dose)	NOEC = 0.94	behavioral dysfunction (knockdown effect)	50	20
	laboratory (several determined doses)	NOEC = 0.2	behavioral dysfunction (proboscis extension reflex)	10	20
	semi-fields (at feeders, several determined doses)	LOEC = 0.075	behavioral dysfunction (feeding)	10	7.5
	fields[a] (at feeders, several determined doses/on plants)	NOEC = 0.25	behavioral dysfunction (dances)	5	50

[a] Feeders contained syrup contaminated by imidacloprid. In field conditions, feeders were placed near hives to reinforce the observed effects of imidacloprid seed-dressed plants on honey bees.

all the taxonomic groups of an ecosystem. To adjust this factor to one taxonomic group (the honey bees), we applied a factor 10. This factor includes all variations found among and within taxonomic groups (inter- and intra-species variations). Therefore, the validated PNEC becomes 0.012/10 = 1.2 pg/bee.

From Sublethal Toxicity Data. In laboratory, semi-field, and field conditions, one or several administered doses might induce behavioral modifications among treated honey bees. When administering a unique oral dose of imidacloprid to honey bees for the testing of the knockdown effect, the lowest validated NOEC was 0.94 ng/bee (*28*). As this value was obtained from a short-term experiment, an assessment factor of 100 should have been applied (TGD). However, this value does not correspond to a LD_{50}; it is a dose that has no impact on honey bees. Moreover, the measured effect is a sublethal effect. Therefore, we applied an assessment factor of 50. The validated PNEC becomes 0.94/50 = 18.8 pg/bee. When administering several oral doses of imidacloprid to honey bees for the testing of the proboscis extension reflex (PER), the lowest validated concentration, after a 10 day experiment, was 0.2 ng/bee (*29*). This value corresponds to a NOEC based on the testing of sublethal effects after a long-term intoxication. Therefore, we applied an assessment factor of 10. The validated PNEC becomes 0.2/10 = 20 pg/bee.

In semi-field conditions, a LOEC (5 d) of 0.075 ng/bee was validated for the testing of the time spent feeding on contaminated syrup (*30*). As this study was conducted in the natural conditions of foragers, an assessment factor of 10 was applied (TGD, *10*). The validated PNEC becomes 0.075/10 = 7.5 pg/bee.

In field conditions, a lowest NOEC (10 d) of 0.25 ng/bee was validated for the testing of dances (*31*). Studies conducted in field conditions present similar conditions to those found in the natural environment of honey bees. Therefore, an assessment factor of 1 should be applied (TGD, *10*), but we selected an assessment factor of 5 because the setting of the feeders is artificial. Therefore, the validated PNEC becomes 0.25/5 = 50 pg/bee.

PEC/PNEC Estimates. According to the previously defined assessment factors, and whatever the level of food contamination is, all the investigated categories of honey bees presented an intoxication risk to imidacloprid (Figure 1). The PEC/PNEC ratio was the highest for winter bees and nurses (between 10 and 100) and the lowest for pollen foragers and larvae (between 1 and 10).

Discussion

The PEC/PNEC derived from the calculation of honey bees' exposure to which appropriate assessment factors were applied show that the risk posed by imidacloprid is alarming for all categories of honey bees. These ratios are all over 1, and greater in adult hive bees than in any other categories of bees. Whatever the validated toxicity data are, the determined PNECs are in a limited range of values (between 1.2 and 50 pg/bee). These estimates are in agreement with observations made in regions of extensive sunflower and maize cultures, which report a decrease in honey production since the launching of imidacloprid on sunflower plants in 1994 (*32*), and several behavioral dysfunctions, foragers disappearances, and great honey bee mortalities in summer, during the blossoming of maize and sunflower plants, and after winter, when all sunflower and maize pollens have been consumed by colonies.

In areas of extensive sunflower and maize cultures treated by imidacloprid, all categories of honey bees, whatever their age is, are at risk of intoxication. In such a situation, honey bees are most likely to bring back food that is contaminated by imidacloprid, and the observed effects might relate to either acute, chronic, or sublethal intoxications, all inducing the death of honey bees.

In areas where sunflower and maize cultures treated by imidacloprid are less abundant, honey bees might be less intoxicated because they might consume a mixture of contaminated and uncontaminated food. In this situation, honey bees are most likely to be intoxicated by sublethal doses, rather than by acute or chronic doses, which might have lethal consequences at the individual and colony levels.

At sublethal doses, pesticides are known to have profound impacts on the colony, in particular on the honey bees' longevity (*34*), the brood production (*35*, *36*), the development of hypopharyngeal glands (*37*), and the egg laying (*38*). Imidacloprid is known to affect the honey bees' cognitive behaviors such as the proboscis extension reflex PER (*33*). Learning and memorization in honey bees' tasks are very important. For example, a forager that is disorientated might get lost and eventually die. In the case of massive foragers' intoxications, the colony is likely to be greatly affected. In an experiment under tunnels, Vandame et al. (*39*) exposed honey bees to deltamethrin at a sublethal dose that is 20-fold lower than the registered dose at which foragers are expected to be exposed to in the environment. They found that 54% of the treated bees were disoriented and took flight toward the sun. The authors concluded that such sublethal effects may be the cause of the symptom called the "disappearance bee disease" by beekeepers who observed colonies' weakening without finding dead bees close to the hives. This hypothesis was formerly raised by other scientists (*40*, *41*).

Imidacloprid can also affect honey bees by chronic intoxications. In the long run, a repeated ingestion of low doses of imidacloprid could cause immunodeficiency and diseases in honey bees. The impairment of the bees' immunity system is a nonspecific mechanism (*42*). For

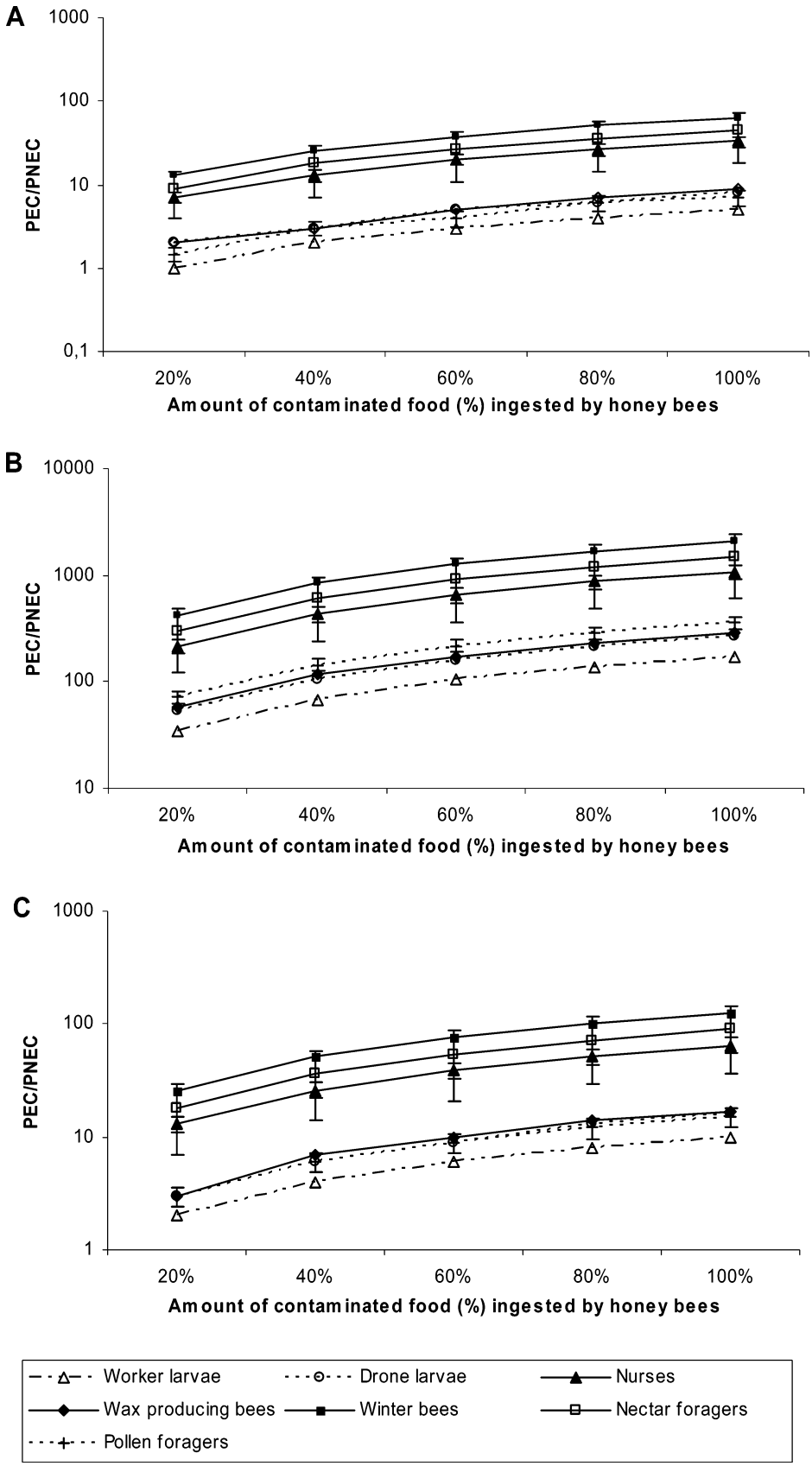


FIGURE 1. Hazard posed by imidacloprid to different categories of honey bees feeding on various proportions of contaminated food: estimated PEC/PNEC ratios derived from (A) acute toxicity data, (B) chronic toxicity data, and (C) sublethal toxicity data obtained in field conditions for foragers and in laboratory conditions for all the other categories of honey bees (a risk is highlighted when ratios are greater than 1).

example, sublethal concentrations of malathion result in higher invasions of treated colonies by the wax moth (*43*).

In some cases, no honey bee troubles were observed by beekeepers, but no scientific study has ever confirmed these

observations. The presence of untreated or very little treated areas near hives, and the presence of compensatory phenomena (increase of brood development, replacement of dead foragers) with no visible harmful consequences for the colony may occur and explain the absence of any observed troubles.

When assessing the risk posed by systemic insecticides, the HQ does not take into account several idiosyncrasic parameters such as persistence in soils, presence in pollen and nectar, and transport in the air. The calculation of the Toxicity Exposure Ratios (TER) (ratio between a toxicological end point and a PEC), regularly used in the risk assessment of pesticides to organisms (mainly vertebrates and nematods), could take into account such crucial parameters. However, for social invertebrates such as honey bees, the use of the new and existing chemical substances approach (herein the PEC/PNEC ratio) should be more appropriate than the use of the TER because it enables the protection of the whole colony. The PEC/PNEC ratio could then be re-calibrated when more data on imidacloprid and on other systemic insecticides are available.

For hive bees (nurses and winter bees), the PNECs could be refined when more data are available on the mechanisms of a colony's regulation (e.g., brood development) in field and semi-field conditions. For larvae, exposures were derived from data obtained on adult toxicities in order to obtain an indicative and comparative value. Given that larvae are more or less sensitive than adults to chemicals (*4*, *44*), more studies need to determine accurately their exposure risk to imidacloprid and to other systemic insecticides.

We could not investigate topical exposures of imidacloprid to honey bees because there are not enough data available on this mode of exposure. However, honey bees' intoxications by topical exposures should not be discarded. For examples, foragers might get contaminated by contaminated dust particles during sowing operations (*45*).

The impact of systemic insecticides on honey bees is not limited to the impact of the parent compound; it also includes exposures to its metabolites. In the case of imidacloprid, some metabolites (e.g., olefin, which is twice more toxic than imidacloprid) are found to be very toxic to honey bees (*9*, *46*, *47*) and some of them are detected at low concentrations (between 0.3 and 1 μg/kg) in rape pollen and nectar (*48*). However, to investigate in further detail the impact of metabolites on honey bees, their concentrations in other types of pollen and nectar must be determined.

Exposures to imidacloprid were estimated by assuming that the molecule is stable in the hive because it is stored in a dark environment. However, the transformation of pollen and nectar into bee bread and honey, respectively, imply the action of several enzymes that might change the stability of imidacloprid. Therefore, the concentration of imidacloprid in the stored food (bee bread and honey) should be measured to test its stability in the hive over time. Honey bees' exposures to contaminated sunflower nectar were determined with data issued from one study (*25*). To confirm and generalize the trend found, it is necessary to conduct more studies (i.e., the concentration of imidacloprid in nectar coming from other varieties of sunflower and from other melliferous plants).

The method and the assessment factors proposed in this paper could be re-calibrated when more data are available. Although the determination of the LD_{50} (48 h) is readily obtained for the calculation of HQ, its representativeness in testing the survival of a honey bee colony is arguable. To assess the risk posed to honey bees, chronic and sublethal toxicity tests must be conducted systematically, especially in the case of systemic insecticides which have a long-lasting action. To achieve these tests, standardized protocols are required and could be elaborated on the grounds of existing experimental studies which have investigated the chronic impacts of systemic insecticides on honey bees (*9*, *49*, *50*), as well as their sublethal effects on the behavior (*41*, *47*, *51*−*53*) and physiology (*38*, *54*, *55*) of these organisms.

Based on the risk assessment method used for terrestrial organisms, this method is original. It includes the assessment of several important parameters such as the following: (*i*) The detection and measurement of the amount of an active ingredient present in the various substrates used by honey bees. These measures are not statutorily requested. (*ii*) The development of various scenarios of honey bees' exposure to the active ingredient. These scenarios better predict the risk posed by systemic insecticides to honey bees because they take into account the biology and particular requirements of a honey bees'colony (*21*). (*iii*) The use of novel and validated methods for the assessment of lethal and sublethal honey bees' intoxications. (*iv*) The use of assessment factors, when experimental designs are tightly related to environmental conditions. This approach is usually applied to assess the risk of chemical substances.

Acknowledgments

Authors M.P.H. and A.R. contributed equally to this work. The validation of the data used in this study on imidacloprid was realized in concert with a group of experts nominated by the French Ministry of Agriculture and known as the "Comité Scientifique et Technique (CST) de l'Etude multifactorielle des troubles des abeilles". M.P.H. and A.R. were financed by the French Ministry of Agriculture to give scientific support to the CST.

Note Added after ASAP Publication

An incorrect reference was cited in Table 1 in the version published ASAP March 7, 2006; the corrected version was published March 8, 2006.

Literature Cited

(1) OEPP/EPPO. EPPO standards PP1/170 (3). Test methods for evaluating the side effects of plant protection products on honeybees. *Bull. OEPP/EPPO* **2001**, *31*, 323−330.
(2) OEPP/EPPO. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 10. *Bull. OEPP/EPPO* **2003**, *33*, 141−145.
(3) Smart, L. E.; Stevenson, J. H. Laboratory estimation of toxicity of pyrethroid insecticides to honeybees: relevance to hazard in the field. *Bee World* **1982**, *62*, 150−152.
(4) Villa, S.; Vighi, M.; Finizio, A.; Serini, G. B. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology* **2000**, *9*, 287−297.
(5) Glynne Jones, G. D.; Thomas, W. D. E. Experiments on the possible contamination of honey with Schradan. *Ann. Appl. Biol.* **1953**, *40*, 546−555.
(6) Knapp, J. L.; Ansonmoye, H. Aldicarb and metabolite residues in nectar following commercial applications to Florida USA Citrus. In *Proceedings of the 6th International Citrus Congress*, Tel Aviv, Israel, March 6−11, 1988; pp 1107−1111.
(7) Comité Scientifique et Technique. Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho) et troubles des abeilles. Rapport du Comité scientifique et Technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles remis au Ministère de l'Agriculture: Paris, 2003.
(8) Elbert, A.; Beckert, B.; Hartwig, J.; Erdelen, C. Imidacloprid − a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachr.* **1991**, *44*, 113−136.
(9) Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2482−2486.
(10) European Commission. *Technical Guidance Document (TGD) in support of commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances*; EC: Brussels, Luxembourg, 1996.
(11) Moritz, R. F. A.; Southwick, E. E. *Bees as superorganisms, an evolutionary reality*; Springler-Verlag: Berlin, 1992; 395 pp.
(12) Heinrich, B. *Bumblebee Economics*; Harvard University Press: Cambridge, MA, 1979.

(13) Williams, I. H. The dependence of crop pollination within the European Union on pollination by honey bees. *Agric. Zool. Rev.* **1994**, *6*, 229−257.
(14) Charvet, R.; Katouzian-Safadi, M.; Colin, M. E.; Marchand, P. A.; Bonmatin, J. M. Insecticides systémiques: de nouveaux risques pour les insectes pollinisateurs. *Ann. Pharm. Fr.* **2004**, *62*, 29−35.
(15) Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Charvet, R.; Fléché, C.; Colin M. E.; Bengsh, E. R. A LC/APCI-MS/MS method for the analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Ann. Chem.* **2003**, *75*, 2023−2027.
(16) Stork, A. A residue of 14C-NTN 33893 (imidacloprid) in blossoms of sunflowers (*Helianthus annus*) after seed dressing. Bayer A. G., Crop Protection Development, Institute for Metabolism Research and Residue Analysis: Leverkusen, 1999; p 56.
(17) MacDonald, L.; Meyer, T. J. Determination of imidacloprid and triadimefon in white pine by gas chromatography/mass spectrometry. *Agric. Food. Chem.* **1998**, *46*, 3133−3138.
(18) Uroz, F. J.; Arrebola F. J.; Egea-Gonzales, F. J.; Martinez-Vidal, J. L. Monitoring of 6-chloronicotinic acid in human urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry as indicator of exposure to the pesticide imidacloprid. *Analyst* **2001**, *126*, 1355−1358.
(19) OECD. *Honey bees, Acute oral toxicity test, OECD's guidelines for the testing of chemicals, Section 2, Effects on biotic systems*; T. G. n*o* 213; OECD: Paris, 1998.
(20) OECD. *Honey bees, Acute contact toxicity test, OECD's guidelines for the testing of chemicals, Section 2, Effects on biotic systems*; T. G. n*o*. 214; OECD: Paris, 1998.
(21) Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M. P.; Touffet-Briens, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **2005**, *36*, 71−83.
(22) Crane, E. *Honey: A Comprehensive Survey*; Heinemann: London, 1975.
(23) Pham-Delègue, M. H. Etude par conditionnement associatif des paramètres olfactifs qui déterminent le comportement alimentaire sélectif de l'abeille. Ph.D. Thesis, University Pierre et Marie Curie, Paris, 1983.
(24) Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Colin, M. E.; Bengsch, E. R.; Lecoublet, S. *Effets des produits phytosanitaires sur les abeilles. Analyse de l'imidaclopride dans les pollens*; Rapport de résultats n*o*. 10; CNRS-CBM, INRA: Orléans, 2001.
(25) Stork, A. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insect.* **2003**, *56*, 35−40.
(26) Schmück, R.; Schöning, R.; Stork, A.; Schramel, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manage. Sci.* **2001**, *57*, 225−238.
(27) Suchail, S. Etude pharmacodynamique de la létalité induite par l'imidaclopride et ses métabolites chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). Ph.D. Thesis, University Claude Bernard, Lyon, 2001.
(28) Wilhelmy, H. *Substance A. Acute effects on the honeybee Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae), NON-GLP*; Laboratorium für angewandte biologie: Sarstedt, 2000.
(29) Decourtye, A.; Armengaud, C.; Renou, M.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Gauthier, M.; Pham-Delègue M. H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic. Biochem. Phys.* **2004**, *78*, 83−92.
(30) Colin, M. E.; Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Gaimon, C.; Brun, S; Vermandère, J. A method to quantify and analyse the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 387−395.
(31) Kirchner, W. H. Mad-bee disease? Sublethal effects of imidacloprid (Gaucho) on the behavior of honey-bees. *Apidologie* **1999**, *30*, 421−422.
(32) Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Charvet, R.; Colin, M. E.; Flèche, C.; Bengsch, E. R. Behaviour of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees. In *Environmental Chemistry, Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems*; Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D., Eds.; Springer: New York, 2005; pp 483−494.
(33) Decourtye, A.; Devillers, J.; Genecque, E.; Le Menach, K.; Budzinski, H.; Cluzeau S.; Pham-Delègue M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honey bee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *48*, 242−250.
(34) Smirle, M. J.; Winston, M. L.; Woodward, K. L. Development of a sensitive bioassay for evaluating sublethal pesticide effects on the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **1984**, *77*, 63−67.
(35) Ferguson F. Long-term effects of systemic pesticides on honey bees. *Australas. Beekeeper* **1987**, 49−54.
(36) Bendahou, N.; Fleche, C.; Bounias, M. Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (Cymbush) on honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **1999**, *44*, 147−153.
(37) Lensing, W. Changes in honey bee workers after feeding them with sublethal dose of dimethoate. *Apidologie* **1986**, *17*, 340−342.
(38) Lensing, W. Changes in honey bee workers after feeding on sublethal doses of dimethoate. *Apidologie* **1987**, *18*, 353−356.
(39) Vandame, R.; Meled, M.; Colin, M. E.; Belzunces, L. P. Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environ. Toxicol. Chem.* **1995**, *14*, 855−860.
(40) Faucon, J. P.; Flamini, C.; Colin, M. E. Evaluation de l'incidence de la deltamethrine sur les problèmes du cheptel apicole: Essais en plein champ. *Bull. Lab. Vétérinaires* **1985**, *18*, 33−45.
(41) Cox, R. L.; Wilson, W. T. Effects of Permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Entomol.* **1984**, *13*, 375−378.
(42) Glinski, Z.; Kauko, L. Immunosuppression et immunotoxicologie: Aspects liés à la protection de l'abeille mellifère contre les agents microbiens et parasitaires. *Apiacta* **2000**, *35*, 65−76.
(43) Nation, J. L.; Robinson, F. A.; Yu, S. J.; Bolten, A. B. Influence upon honey bees of chronic exposure to very low levels of selected insecticides in their diet. *J. Apic. Res.* **1986**, *25*, 170−177.
(44) Atkins, E. L.; Kellum D. Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood. *J. Apic. Res.* **1986**, *25*, 242−255.
(45) Greatti, M.; Sabatini, A. G.; Barbattini, R.; Rossi, S.; Stravisi, A. Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. *Bul. Insect.* **2003**, *56*, 69−72.
(46) Nauen, R.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Schmuck, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest. Manag. Sci.* **2001**, *57*, 577−586.
(47) Decourtye, A.; Lacassie, E.; Pham-Delègue, M. H. Learning performance of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to season. *Pest Manage. Sci.* **2003**, *59*, 269−278.
(48) Scott-Dupree, C. D.; Spivak, M. S. The impact of Gaucho and TI-435 Seed-treated canola on honey bees, *Apis mellifera* L.; University of Guelph, Ontario, Canada, University of Minnesota, MN, 2000; p 18.
(49) Stoner, A.; Wilson, W. T.; Rhodes, H. Carbofuran: effect of long-term feeding of low doses in sucrose syrup on honey bees in standard-size field colonies. *Environ. Entomol.* **1982**, *11*, 53−59.
(50) Moncharmont, F. X. D.; Decourtye, A.; Hennequet-Hantier, C.; Pons, O.; Pham-Delègue, M. H. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 3088−3094.
(51) Johansen, C. A. Behavior of pollinisators following insecticide exposure. *Am. Bee J.* **1984**, March, 225−227.
(52) Taylor, K. J.; Waller, G. D.; Crowder, L. A. Impairment of classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. *Apidologie* **1987**, *18*, 243−252.
(53) Thompson, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees. Their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* **2003**, *12*, 317−330.
(54) Bounias, M.; Dujin, N.; Popeskoviae, D. S. Sublethal effects of synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees. *Pestic. Biochem. Phys.* **1985**, *24*, 149−160.
(55) Papaefthimiou, C.; Theophilidis, G. The cardiotoxic action of the pyrethroid insecticide deltamethrin, the azole fungicide prochloraz, and their synergy on the semi-isolated heart of bee *Apis mellifera macedonica*. *Pestic. Biochem. Phys.* **2001**, *69*, 77−91.

Received for review July 18, 2005. Revised manuscript received February 2, 2006. Accepted February 3, 2006.

ES051392I

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. Touffet
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 Béchec	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. Touffet	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

PREAMBULE **5**

RESUME **6**

PREMIERE PARTIE : IMIDACLOPRIDE ET METABOLITES **6**

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

DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES RISQUES **8**

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

TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR L'ACQUISITION DES DONNEES AYANT FAIT DEFAUT AU COURS DE L'EVALUATION DES RISQUES **12**

8. Recommandations 12
9. Travaux à réaliser pour compléter l'étude multifactorielle 12

PREMIERE PARTIE: IMIDACLOPRIDE ET METABOLITES **13**

1 LISTE DES RAPPORTS ET PUBLICATIONS RECENSES SUR LES TROUBLES DES ABEILLES **13**

2 RAPPEL DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES **13**

2.1 Identité 13
2.2 Propriétés physiques et chimiques 14
2.3 Comportement dans l'environnement 14

3 DONNEES D'EXPOSITION **14**

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
   3.5.3 Dosages de l'imidaclopride dans le nectar de tournesol 41
   3.5.4 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

4 DONNEES DE TOXICITE **43**

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 aigue (1 seule administration)....76
4.3.2 Intoxication Chronique....76
4.3.3 Effets sublétaux....77

DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES RISQUES 82

5 EVALUATION DES EFFETS 82

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

6 EVALUATION DE L'EXPOSITION 87

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

7 EVALUATION DES RISQUES....94

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

TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR L'ACQUISITION DES DONNEES AYANT FAIT DEFAUT AU COURS DE L'EVALUATION DES RISQUES....103

8 RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES DONNEES D'EXPOSITION DES ABEILLES 103

8.1 Données à acquérir concernant l'imidaclopride et ses métabolites 103
8.2 Recommandations générales....103

9 RECOMMANDATIONS CONCERNANT LES DONNEES DE TOXICITE PAR ADMINISTRATION REITEREE DE SUBSTANCE ACTIVE....103

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

10. TRAVAUX A REALISER POUR COMPLETER L'ETUDE MULTIFACTORIELLE 105

DEFINITIONS....106

ANNEXES.... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

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 » à été intégré a 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 sublétale. 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_{50} 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_{50} 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 réitérée 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 réitérée 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 réitérée 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 réitérée 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 réitérées 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 réitérée 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 sublétale 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**
Intoxication par voie orale				
Toxicité aiguë				
DL50 48h = 4 ng/ab		Mortalité	100	40 pg/ab
Toxicité chronique par voie orale				
DL50 10j = 0,012 ng/ab		Mortalité	10	1,2 pg/ab
Toxicité sublétale				
Laboratoire	**1 seul traitement par voie orale** NOEC = 0,94 ng/ab	Modifications comportementales	50	20 pg/ab
	Traitement réitéré par voie orale NOEC = 0,2 ng/ab	Modifications comportementales	10	20 pg/ab
Sous tunnel	**Sur nourrisseur, traitement réitéré** LOEC = 0,075 ng/ab	Modifications comportementales	10	7,5 pg/ab
Plein champ	**Sur nourrisseur, traitement réitéré** NOEC = 0,25 ng/ab	Modifications comportementales	5	50 pg/ab
Intoxication par voie topique topique				
Toxicité aiguë				
DL50 = 6,7 ng/ab		Mortalité	100	67 pg/ab
Toxicité sublétale				
Laboratoire	**1 seul traitement par voie orale** 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 :

	Rapport PEC/PNEC selon le pourcentage de contamination des produits consommés		
Scénario	**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		**Absence de données :** - 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*)	**Absence de données :** - 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*)	**Scénario reposant sur une estimation** 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	**Absence de données :** - de dosages de résidus dans le miel stocké à la ruche **Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar**
Scénario 5 : consommation de miel par les abeilles d'intérieur	9,5 à 190 (3166*)	maïs = plante non nectarifère	**Absence de données** : -de dosages d'imidaclopride dans le miel -sur la stabilité de l'imidaclopride dans le miel lors de son stockage dans la ruche **Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar**

* 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 RECENSES 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).

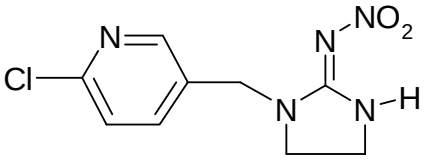
Parmi ces documents, le Ministère a fourni 245 rapports d'études ou documents associés en rapport avec les troubles des abeilles. Parmi ceux ci 49 références portant sur l'imidaclopride ont été fournies par la société Bayer, 21 études fournies par les sociétés Bayer, Aventis et Rhone Poulenc portent 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 : nitromethylene ; Dénominations : imidaclopride
Noms chimiques : 1H-IMIDAZOL-2-AMINE, 1-[(6-CHLORO-3-PYRIDINYL) METHYL]-4,5-DIHYDRO-N-NITRO-
Formule brute : C9 H10 Cl N5 O2
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 µPa 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 µg/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 µg/kg (ppb) (LQ)
- La limite de détection en µg/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[$] des dosages d'imidaclopride dans les pollens (T = pollen de de tournesol, Mt = pollen de maïs de trappes, Mf = pollen de maïs, C = polen 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 *et al*., 1999	Bayer	HPLC-MS/MS
T	2	5	1,5	**ND**	M11 Schmuck *et al*., 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

[$] Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.
Les études <u>en blanc</u> 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}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 placé 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.

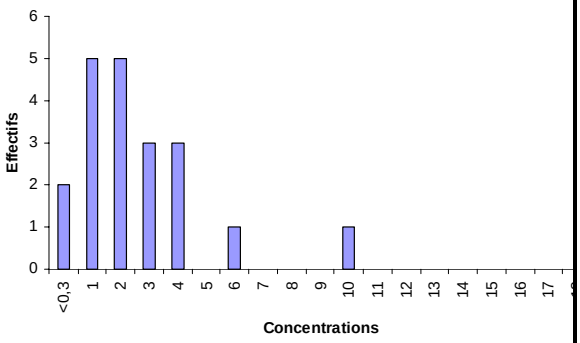
Par ailleurs, la description des protocoles et les rapports d'études doivent être clairs et acceptables par les experts du CST. Le laboratoire CNRS/CBM a réalisé environ la moitié des études de dosages, certains des rapports soulevant des interrogations. C'est pourquoi un groupe d'experts du CST (Arnold, 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[$] dans les pollens de tournesol traité Gaucho

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

- : calcul et répartition impossible en raison du pool des données ; [$] 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.

[1] 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^3) est comparable à une situation en champs (1300cm^3). 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 convergeant 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).

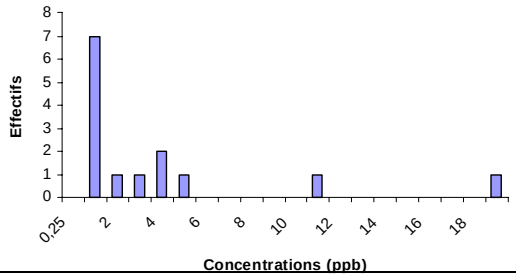
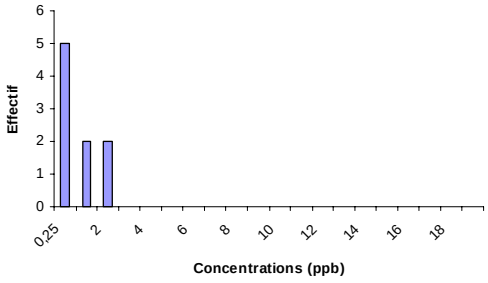
* ***Dosages dans les pollens de maïs***

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[$] d'imidaclopride dans les pollens de maïs

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

[$] 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

[2] 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[3] (ppb)	Répartition
Pollen de trappe sur zone Colza enrobée Gaucho (Scott-Dupree & Spivak, 2000, M143	16	Imidaclopride	**3,15<m<3,5** mediane=2,45 90ème percentile = 6,64 10ème 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.

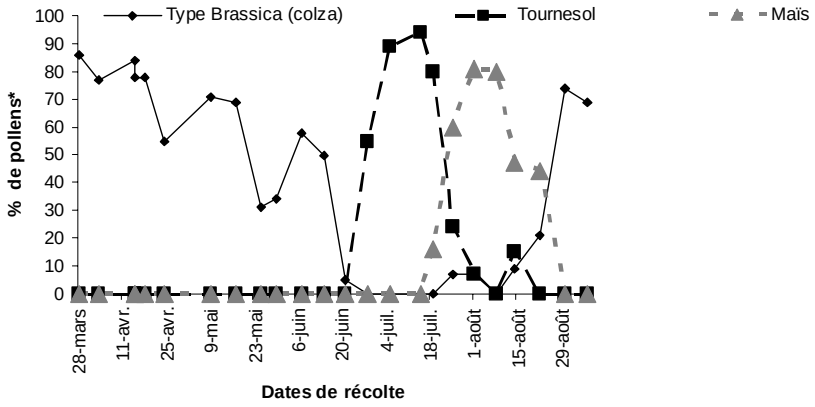
c) Commentaires et perspectives

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 le 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 2ème quinzaine de juillet.

[3] 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[$] 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 *et al.*, 1999	Bayer	HPLC-MS/MS
T	1	5	1,5	**ND**	M11 Schmuck *et al.*, 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

[$] 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 Minesota) 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[1] (ppb)	Répartition
Nectar de Colza enrobé Gaucho (Scott-Dupree & Spivak, 2000, M143)	16	Imidaclopride	**0,5<m<0,85** mediane=0,55 90ème percentile = 0,74 10ème percentile = 0,5	-
		Oléfine Hydroxyimidaclopride	**<LQ(1)**	

- 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 imidaclopide ont exprimées en µg/kg de poids frais ou de poids sec de sols.

Tableau VII : Dosages annoncés[$] 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[¥]	HPLC-MS-MS (rapport ion mère/ion fille sans NO_2	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[¥]	HPLC-MS-MS (rapport ion mère/ion fille sans NO_2	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[¥]	HPLC-MS-MS (rapport ion mère sans NO_2/ion fille sans NO_2 et sans Cl	Cultures biologiques	6	Non renseigné	<LD	0,13	1
		Juste après culture imidaclopride	10		m=10 Max = 21,9 <LQ (n=1) >LQ (n=9)		
		Juste après culture non imidaclopride, pas d'antécédent à A-1 et A-2	10		m<LQ max = 1,5 <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[£]	2	6
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

[$] Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études. **Les études <u>en blanc</u> 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. [¥] 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. [§] Les valeurs annoncées correspondent aux résultats des dosages après 5 ans de traitement imidaclopride.

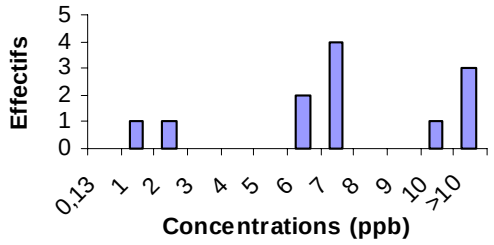
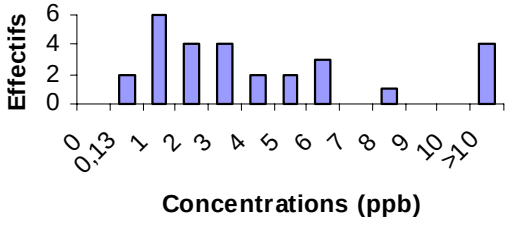
b) Validité des résultats

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[$] d'imidaclopride dans les sols à cultures de tournesol

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

; [$] 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

[4] 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 reçus 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

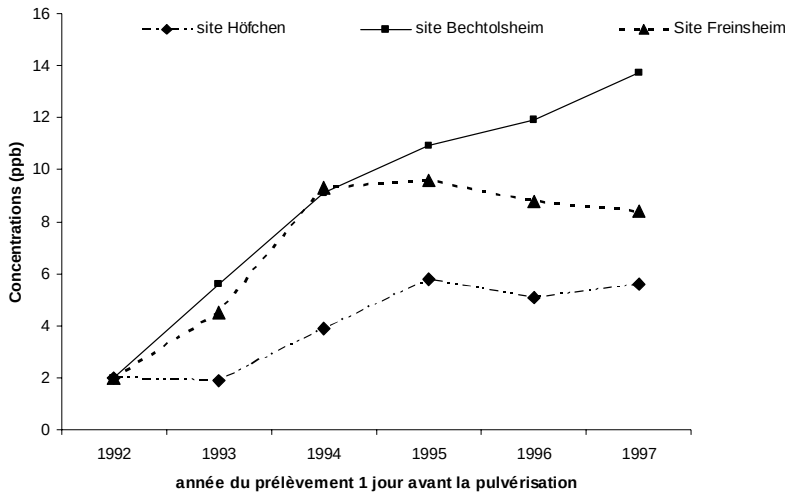
Malgré l'intérêt de ces études, nous ne les retiendrons pas dans notre évaluation en raison de la spécificité des traitements qui ne correspondent pas à notre cas de semences enrobées Gaucho.

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 débutde 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 imidaclopide sont exprimées en µg/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[$] de l'imidaclopride dans le Tournesol

Rapport	Méthode	Culture	Antécédents imidaclopride*	Type d'échantillons	Stade de croissance[£]	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
				fleurs		1	**<LD**		
		Tnon Gaucho	Antécédents de A-0,5 à A-1,5	Feuilles supérieures	Pic floraison	3	**<LD**		
				fleurs		3	**<LD**		
M31 Lagarde, 2000 Etude T99GSP[¥]	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[¥]	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

[$] Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

Les études <u>en blanc</u> 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. [¥] Les teneurs sont exprimées en µg/kg de poids frais.

[£] voir Annexe X.

Tableau IX (suite): Dosages annoncés[$] de l'imidaclopride dans le Tournesol

Rapport	Méthode	Culture	Antécédents imidaclopride*	Type d'échantillon	Stade de croissance[£]	n	Imidaclopride (µg/kg)	LD	LQ
M111 Laurent et Scalla, 2000[¥]	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		5	**2757**		
				Feuilles supérieures	E4	5	**143**		
				Tiges inférieures		5	**76**		
				Tiges supérieures		5	**14**		
				Dos capitules		5	**33**		
				Plateau floral		5	**9,5**		
				Feuilles supérieures	F	5	**521**		
				Tiges supérieures		5	**1**		
				Dos capitule		5	**4**		
				Involucre		5	**22**		
				Réceptacle		5	**14**		
				gaine		5	**27**		

[$] Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

Les études <u>en blanc</u> 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. [¥] Les teneurs sont exprimées en µg/kg de poids frais.

[£] voir Annexe X.

Tableau X : Dosages annoncés[$] 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)		

[$] Les résultats de ce tableau apparaissent tels qu'ils sont présentés dans les études.

Les études <u>en blanc</u> 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.

* ***<u>Tournesol</u>***

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.

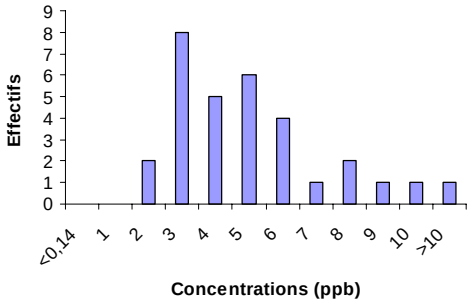
Concernant le tournesol, dans le rapport M21, le laboratoire CNRS/CBM s'intéresse à la biodisponibilité de l'imidaclopride dans le tournesol en fonction du stade de croissance, de la variété de la plante et en fonction de la dose d'insecticide utilisée pour l'enrobage de semences. Malheureusement, nous 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[$] d'imidaclopride dans les Tournesols

Type d'échantillon	Effectif	Teneur en imidaclopride (ppb)[5]	Répartition
Tournesol traité Gaucho l'année du prélèvement	31	**m=4,6** med = 4,02 90ème percentile = 7,2 10ème percentile = 2,1	

[$] 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 corréler 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.

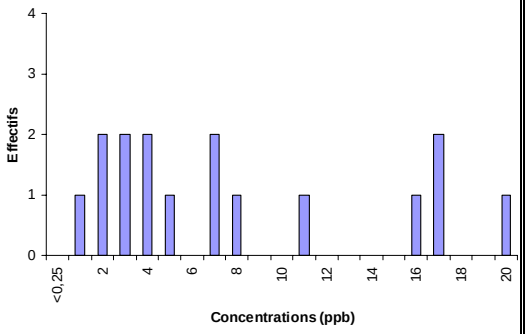
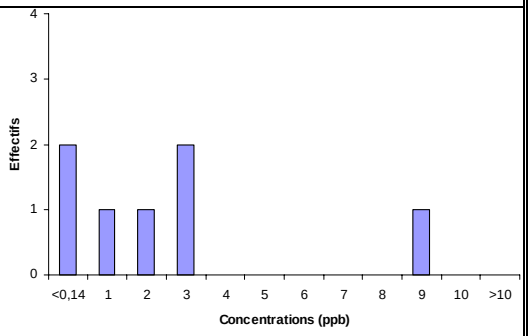
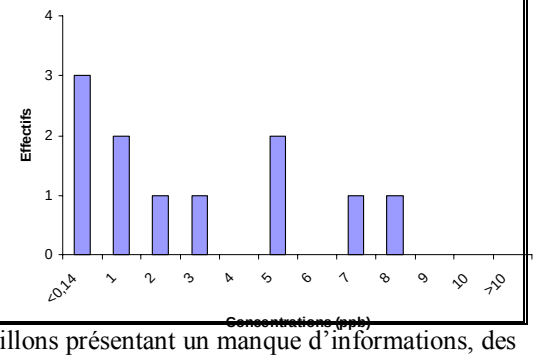
* ***Maïs***

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 differences et des ambiguités portant sur certains échantillons, il est suggéré de ne prendre en compte, pour le dosage de l'imidaclopride dans les panicules de maïs de

[5] 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[$] d'imidaclopride dans différentes parties végétales de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement.

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

[$] 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.

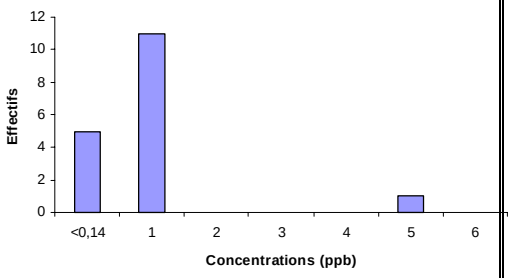
* ***Plantes autre que tournesol et maïs***

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

[6] 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[7] (ppb)	Répartition
Parties végétales de Colza non traité Gaucho l'année du prélèvement mais cultivé sur sol à antécédent Gaucho.	17	**0,39<m<0,98** mediane= 0,5 90ème percentile = 0,5 10ème 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, secrété 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

[7] 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^2, pour 1 km, elle est de 3,14 km^2 ; pour 5 km, elle est de 78,5 km^2. 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 (Louveaux, 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 (Louveaux, 1985, A91 ; Pham-Délègue 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 % (Louveaux, 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 (Louveaux, 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	**2,1<m<2,3** médiane = 1,6 90ème percentile = 3,9 10ème percentile = 0,5
Tf	M5, Stork, 1999	**3,3<m<3,4**
Mt	M210, Bonmatin, 2002	**0,69<m<0,81** médiane = 0,215 90ème percentile = 1,36 10ème percentile = 0,215
Mf	M210, Bonmatin, 2002	**3,28<m<3,65** médiane = 1,2 90ème percentile = 8,55 10ème 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 = tourensol

Etudes et résultats validés : **1**

Plantes	Références	Teneurs moyennes validées (ppb)
Tf	M5, Stork, 1999	**m = 1,9**

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	**10,2<m<10,3** médiane = 7,45 90ème percentile = 20,18 10ème 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	**4,29<m<4,48** médiane = 2,35 90ème percentile = 12,75 10ème 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	**m=4,6** médiane = 4 90ème percentile = 7,2 10ème 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	**Feuilles : 0,8<m<1,1 ;** médiane = 0,07 ; 90ème percentile = 2,1; 10ème percentile =0,07 **Tiges : 4,5<m<4,7;** médiane = 0,5 ; 90ème percentile = 11,8; 10ème percentile =0,07
Feuilles et tiges de maïs traité Gaucho l'année du prélèvement	M21 et documents associés (M17, M150), Bonmatin, 2002	**3,6<m<3,8**, 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	**3<m<3,1**, mediane=2,6 ; 90ème percentile = 6 10ème percentile = 0,5
Panicules de Maïs traité Gaucho l'année du prélèvement	M209, Bonmatin, 2002	**m=7,5** médiane = 5,8 90ème percentile = 16,5 10ème 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 (1seule administration) par voie orale

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

* 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_{50} 48h ng ma/ab
M134 Cole, 1990	*Apis mellifera*	inconnu	Août	2x10 abeilles par dose 5 doses	imidaclopride *99,8%*	DMF	1µL	**81**
M7 Schmitzer 1995	*Apis mellifera*	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	**60**
M8 Schmitzer 1995	*Apis mellifera*	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	**242,6**
Cité dans A26 Schmuck *et al.*, 2001 (Bayer)	*Apis mellifera*							**230,3**
M47 Suchail, 2001	*Apis mellifera mellifera* *Apis mellifera caucasica*	Supposé >20j		3 x 20 abeilles par dose 3 répétitions	Imidaclopride *98%*	DMSO	1µL	**6,7** [4,4-9] **24,3** [22-26,6] (courbe biphasique) **12,8** [9,7-15,9]
M217 Wilhelmy, 2000 (pour Bayer)	*Apis mellifera carnica*	Jeunes ouvrières	5-8 mai	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Imidaclopride *98%*	acétone	5µl/abeille	**42,9**
M218 Thompson, 2000 (pour Bayer)	*Apis mellifera*	2 jours à 3 semaines	8-11 mai	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Imidaclopride *98%*	acétone	1µl/abeille	**50**
M220 Barth, 2000 (pour Bayer)	*Apis mellifera*	Ouvrières adultes	31juin-2 juillet	3 x 10 abeilles par dose 5 doses	Imidaclopride *98%*	acétone	1µl/abeille	**74,9**

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_{50}. La DL_{50} de l'imidaclopride sert de référence pour comparer les DL_{50} 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_{50} 48h ng/ab 5–hydroxy	DL_{50} 48h ng/ab oléfine	Rappel DL_{50} imidaclopride ng/ab
M135, M136 Schmitzer, 1999 (Bayer)	*Apis mellifera*	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)	*Apis mellifera mellifera*	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)	*Apis mellifera ligustica*	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 aigue (1 seule administration) respectent les directives OCDE n°213[8] (toxicité suite a une adminstration par voie orale) et n°214 (toxicité suite à une administration par contact)[9] 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 aigue (1 administration) par voie orale, les DL_{50} 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_{50} 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_{50} 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_{50} 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 aigue font apparaître 2 types de courbes : une courbe avec une relation dose/effet habituelle (DL_{50} 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_{50} : 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_{50}>1000 ng/abeille) (Suchail, 2001, M47).

[8] Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (*Original Guideline, adopted 21st September 1998*)
[9] Honeybees, Acute Contact Toxicity Test *(Original Guideline, adopted 21st September 1998)*

Les DL_{50} 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_{50} à 48h >35,7 ng/abeille, Suchail, une DL_{50} à 48h de 28 ng/abeille et Decourtye, une DL_{50} 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_{50} allant de 4 à 71 ng d'imidaclopride par abeille. Tous les rapports d'études disponibles sont validés.
Plus généralement, les valeurs de DL50 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_{50} 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_{50} 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 DL50 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 réitérée de la substance active)

Bien que des essais de toxicité chronique ne soient pas obligatoires pour l'autorisation de mise sur le marche 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 ces 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 ces 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	Ages 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[#] DL50 = 0,1ppb	DL50=0,1ppb (12 pg/ab/10j)
M13, M32, M162, M165; DeCourtye et al INRA de Bures, 1998[£]	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[$], 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[+]; 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 ; [#] : estimations obtenues à partir de graphiques ;[$] 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.[£]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 ; [+] 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	Ages abeilles/ Période test	Substance testée	Nbre d'abeille	Concentrations testées/ durée de contamination	% de mortalité à 10 jours (selon les concentrations)	NOEC, LOEC DL_{50}
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_{50}=0,1ppb (12 pg/ab)
		Oléfine			<15; 58; 60; 61	DL_{50}=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[$], 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 réitérée d'imidaclopride par voie orale (suite)

Références	Ages abeilles/ Période test	Substance testée	Nbre d'abeille	Concentrations testées/ durée de contamination	% de mortalité à 10 jours (selon les concentrations)	NOEC, LOEC DL_{50}
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+, 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 ; $ 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, XVII, 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 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 réitérée) 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 dérivées 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 postériori 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'ages 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 réitérées 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'age 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'ages 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'age 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'ages 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 parait 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 réitérée). 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 forcement 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 réitérée de l'imidaclopride et de ces métabolites montrant un effet en toxicité aigue (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 [(1)]), 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 [(2)]), 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 administration (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 sur 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-Delègue 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 ; Dresher 1990, M32 ; Guez *et al.* 2001, A31 ; Thompson 2000, M218 ; Wilhelmy 2000, M217) (cfTableau 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+, délai d'observation*	Effets observés	NOEC	LOEC
Barth, 2000 /**M220**	4, 24 et 48 h*	Effet knockdown et coordination motrice	**9 ng/ab[1]**	**27 ng/ab[1]**
Colin, 1998 / **M32, M115, M233, M238**	Quelques heures à 24 h*	Quantité de sirop ingérée	**3,3 ng/ab[1]* (50ppb)**	**3,3 ng/ab[1]* (100ppb)**
		Effet knockdown	**-**	**5,8 ng/ab[1]* (200ppb)**
Decourtye et Pham Délègue, 1998 / **M13, M32, M232**	Environ 2 h+,*	REP	**9,9 ng/ab[1] (300ppb)**	**-**
Kirchner, 1999 / **M12** partie II Kirchner, 2000 / **M14** partie II ou **M40**	Quelques minutes+,*	REP	**1,25 à 3,5 ng/ab[2] (50ppb)**	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100ppb)**
Schmitzer, 1999 / **M6** Schmuck et Schöning, 1999 / **M9**	< 3h+ et 1, 2, 4, 24, 48, 72 et 96 h*	Coordination motrice	**1,5 ng/ab[1]**	**3,1 ng/ab[1]**
Thompson, 2000 /**M219**	4, 24 et 48 h*	Effet knockdown et coordination motrice	**8,2 ng/ab[1]**	**24,6 ng/ab[1]** (dés 4h)
Wilhelmy, 2000 /**M217**	4, 24, 48 et 96 h*	Effet knockdown et coordination motrice	**0,94 ng/ab[1]**	**34,7 ng/ab[1]**

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

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis.
Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités connues[1] ou estimées[2] 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[+], délai d'observation *	Effets observés	NOEC	LOEC
Colin, 1998 / **M32, M115, M233, M238**	5 jours*	Consommation de pollen et production de cire	-	**0,31 à 0,87 ng/ab[2] (12,5ppb)**
	> 1 mois*	Reconnaissance entre apparentés	-	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**
Decourtye et Pham Délègue, 1998 / **M13, M32, M232**	11 jours[+, *]	REP	-	**0,13 ng/ab[1] (4ppb)**
Pham-Delègue et Decourtye, 2000 / **M33** Partie I	11 jours[+, *]	Quantité de sirop ingérée, études d'hiver	**1,6 ng/ab[1] (48ppb)**	-
		REP, études d'hiver	**0,8 ng/ab[1] (24ppb)**	**1,6 ng/ab[1]** (48ppb)
Partie II		REP, études d'été	**0,2 ng/ab[1]** (6ppb)	**0,4 ng/ab[1] (12ppb)**
Kirchner, 1999 / M12 partie II Kirchner, 2000 / **M14** partie II ou **M40**	10-12 jours[+, *]	REP	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**	-

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis. Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités mesurées[1] ou estimées[2] 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[+], délai d'observation*	Effets observés	METABOLITES	NOEC	LOEC
Barth, 2000 /**M227**	Toutes les 24 h pendant 10 jours[+, *]	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	**0,007 ng/ab[1] (0,1ppb)**	-
Barth, 2000 /**M223**	Toutes les 24 h pendant 10 jours[+, *]	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	**0,008 ng/ab[1] (0,1ppb)**	-
Bruhnke, 2000 **/M228**	2, 4, 6, 8, 10 j[+, *]	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	-	**0,0022 ng/ab[1] (0,1ppb** dés le 6e jour**)**
Kling, 2000 /**M222**	Tous les jours X 4 j[+, *]	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	**0,0075 ng/ab[1] (0,1ppb)**	-
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[+, *]	Quantité de sirop ingérée, études d'hiver	Oléfine	**1,5 ng/ab[1] (45ppb)**	-
			Hydroxy-imidaclopride	**0,5 ng/ab[1] (15ppb)**	**1 ng/ab[1] (30ppb)**
		REP, études d'hiver	Oléfine	**1,5 ng/ab[1] (45ppb)**	-
			Hydroxy-imidaclopride	**2 ng/ab[1] (60ppb)**	**4 ng/ab[1] (120ppb)**
Thompson, 2000 /**M226**	2, 4, 6, 8, 10 j[+, *]	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	-	**0,008 ng/ab[1]** (dés le 1e jour)
Thompson, 2000 /**M221**	Tous les jours pendant 10 jours	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	-	**0,008 ng/ab[1]** (dés le 3e jour)
Wilhelmy 2000 /**M225**	2, 4, 6, 8, 10 j	Effet knockdown et coordination motrice	Dérivé urée	-	**0,004 ng/ab[1] (0,1ppb** dés le 6e jour)
Wilhelmy 2000 /**M229**	2, 4, 6, 8, 10 j	Effet knockdown et coordination motrice	Acide 6-chloronicotinique	-	**0,004 ng/ab[1] (0,1ppb** dés le 6e jour**)**

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis. Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités connues[1] ou estimées[2] 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 administration d'imidaclopride par voie topique

Auteurs, Année / Référence	Méthode d'application	Délais d'observation	Effets observés	NOEC	LOEC
Armengaud *et al.*, 2002 / **A36**	1 application sur le thorax	15, 30, 60 min	Seuil du REP	**2,5 ng/ab[1]**	**5 ng/ab[1]** (après 1 h)
			Fréquence des mouvements : **1**/-Augmentation **2**/-Diminution (effet knockdown)	-	**1/-1,25 ng/ab[1]** (indép. temps) et **2,5 ng/ab[1]** (après 15 mn) **2/-5 ng/ab[1]** (après 30 mn)
			Habituation du REP	-	**1,25 ng/ab[1]** (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	-	**40 ng/ab[1]** (après 24 h)
Colin *et al* 1998 et 1999 / **M32, M115, M232, M238**	Non précisée	1 à 2 h	Effet knockdown	-	**1 ng/ab[1]**
De courtye et Pham Délègue, 1998-1999 / **M13, M32, M174, M232**	Sol de la cagette contaminé à l'imidaclopri de pendant toute la durée de l'expérience	13 jours	Seuil d'arrêt du REP Capacité d'apprentissage	**10 ng/ab[1]**	-
Dresher, 1990 /M39	Pulvérisation sur l'abeille entière	24 à 72 h	Comportement de nettoyage et troubles respiratoires	-	**360 ppm**
Guez *et al.*, 2001 / **A31**	1 application imidaclopride sur le thorax	15, 60 min, 4h	REP abeilles de 4-7 jours Effet : habituation plus difficile	-	**0,1 ng/ab[1]** (après 15 mn et 4 h) **10 ng/ab[1]** (après 1 h)
			REP abeilles de 8-10 jours Effet : habituation plus facile	-	**0,1 ng/ab[1]** (après 15 mn et 1 h)
			Effet : habituation plus difficile	-	**1 ng/ab[1]** (après 4 h)
Thompson, 2000 /M218	1 application sur le thorax	4, 24 et 48 h	Effet knockdown et coordination motrice	-	**40 ng/ab[1]** (après 4 h)
Wilhelmy, 2000 /**M217**	1 application sur le thorax	4, 24 et 48 h	Effet knockdown et coordination motrice	-	**40 ng/ab[1]** (après24h)

REP: Réflexe d'Extension du Proboscis. Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités connues[1] ou estimées[2] 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)					
Effets observés	Imidaclopride	Oléfine	Di-Hydroxy-imidaclopride	5-Hydroxy-imidaclopride	Acide 6- chloro nicotinique	Dérivé urée
Coordination motrice et effet knockdown	NOEC[1]=0,94 à 9 LOEC[1] = 3,1 à 34,7 LOEC[3]=5 à 40			NOEC[1]=1,2 LOEC[1]=4,6	LOEC[2]=0,002 à 0.007	LOEC[2]=0,004 à 0.008
Réflexe d'extension du proboscis	NOEC[1]=1,25 à 3,5 LOEC[1]= 2,5 à 7 NOEC[2]=0,2 à 0,7 LOEC[2]=0,4 LOEC[3]=0,1à 10	NOEC[1]=2,5 à 7 LOEC[1]=12,5 à 35	NOEC[1]=2,5 à 7 LOEC[1]=5 à 14			
Perception olfactive	LOEC[3]=10					
Consommation de pollen	LOEC[2]=0,31 à 0,87					
Production de cire	LOEC[2]=0,31					
Reconnaissance entre apparentés	LOEC[2]=0,25 à 0,7					

[1] intoxication orale aiguë ; [2] intoxication orale chronique (10 à 12 jours) ; [3] intoxication topique aiguë

Les études qui remplissent les critères de validation cités dans le paragraphe4.2.1 (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-Délègue (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 aigues.
-

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 Na Cl / sirop 2 M sans imidaclopride	4 fois 30 min X 2 h	Temps de recherche de la ruche	-	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100ppb)**
		Non précisé X quelques heures à plusieurs mois (selon les facteurs étudiés)	Nombre de contacts trophallactiques	-	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100ppb)**
			Danses tremblantes	-	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100ppb)**

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées[2] 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 *et al.*, 1998 / **M32, M115, M238**	2 h / jour X 4 jours	Fréquentation du nourrisseur	**0,63 à 1,75ng/ab[2] (25ppb)**	**1,25 à 3,5 ng/ab[2] (50ppb)**
		Quantité de sirop prélevée	-	**<u>0,63</u> à 1,75ng/ab[2] (25ppb)**
		Durée de la prise alimentaire	-	**0,15 à 0,42 ng/ab[2] (6ppb)**
Colin et Bonmatin, 2000 / **M3, M114, M193**	2 h / jour X 5 jours	Fréquentation du nourrisseur	-	**<u>0,075</u> à 0,21 ng/ab[2] (3ppb)**
		Durée de la prise alimentaire	-	**<u>0,075</u> à 0,21 ng/ab[2] (3ppb)**
Decourtye et Pham-Delègue, 1998 / M32, M174, M233	1-2 h / jour X 4 semaines	Recrutement des butineuses	-	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**
		Reconnaissance des odeurs	-	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**
		Entrées-sorties de la ruche	-	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées[2] de liquide qu'une abeille ingère. Les concentrations en ppb correspondent aux concentrations nominales de la solution contenant l'imidaclopride Les parties **<u>en blanc</u>** 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	-	**<u>0,02</u> à 0,05 ng/ab[2] (0,75ppb)**
			Monohydroxy-imidaclopride	**<u>0,075</u> à 0,21 ng/ab[2] (3ppb)**	-
		Durée de la prise alimentaire	Oléfine	-	**<u>0,02</u> à 0,05 ng/ab[2] (0,75ppb)**
			Monohydroxy-imidaclopride	-	**<u>0,075</u> à 0,21 ng/ab[2] (3ppb)**

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées[2] de liquide qu'une abeille ingère. Les concentrations en ppb correspondent aux concentrations nominales de la solution contenant l'imidaclopride. Les parties **<u>en blanc</u>** 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-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[2] (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 *et al.* 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[2] (20ppb)**	-

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées[2] 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 *et al.*, 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 (2iers jours) Traités > témoin et N > N/2 (7 derniers jours)
			Intensité du butinage	Traité > témoin
Schmuck. *et al.*, 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 1er et le 2ème jour d'observation (Ambolet *et al.* 1997, M158) et une augmentation à partir du 2e jour sur les cultures traitées.
- Une diminution du recrutement dans le lot d'abeilles traitées (Decourtye et Pham Délègue 1998, M32, M174, M233).
- Une affectation des capacités de reconnaissance d'une odeur dans le lot d'abeilles traitées (Decourtye et Pham Délègue 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)		
Effets observés	Imidaclopride	Oléfine	Hydroxy-imidaclopride
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	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	**25 à 70 ng/ab[2] (1000 ppb)**
			Tremblements, immobilité sur le nourrisseur	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	**25 à 70 ng/ab[2] (1000 ppb)**
Belzunces *et al.* 1998 / M32, M244	Sirop 50 % avec imidaclopride / Sirop 50 % sans imidaclopride	4 h / j X 10 j à 11 j	Retour au nourrisseur	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	**25 à 70 ng/ab[2] (1000 ppb)**
			tremblements du corps, envol difficile et immobilisme lors du butinage	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	**25 à 70 ng/ab[2] (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	**0,5 à 1,4 ng/ab[2] (20 ppb)**	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**
		2h/jour X 10jours max pour une cohorte (selon les facteurs étudiés)	Danses frétillantes	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**	**0,5 à 1,4 ng/ab[2] (20 ppb)**
			Danses tremblantes	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**	**0,5 à 1,4 ng/ab[2] (20 ppb)**
			Précision distance	**0,5 à 1,4 ng/ab[2] (20 ppb)**	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**
			Précision angle	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**	**0,5 à 1,4 ng/ab[2] (20 ppb)**

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées[2] 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 / **M12** partie I Kirchner, 1998 et 2000 / **M14, M84** partie I	Sirop 2 M avec oléfine / sirop 2 M sans oléfine	4 fois 30 min X 2 h	Présence au nourrisseur	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	-
		2h/jour X 10jours max pour une cohorte (selon les facteurs étudiés)	Danses frétillantes	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	-
			Danses tremblantes	**0,25 à 0,7 ng/ab[2] (10ppb)**	**0,5 à 1,4 ng/ab[2] (20 ppb)**
			Précision distance	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	-
			Précision angle	**2,5 à 7 ng/ab[2] (100 ppb)**	-

Les résultats des NOEC et LOEC sont calculés à partir des quantités estimées[2] 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 *et al*., 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 (1er 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 *et al*., 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 a 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 frétillantes (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 Km²). 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)	
Effets observés	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 frétillantes	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 Km² / 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 sublétal peut devenir, à terme létal. 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 moura alors rapidement de faim ou de froid. L'effet sublétal, 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 aigue (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 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'age, 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	**DL50 = 0,1 ppb (12pg/ab pendant 10jours)**
M33 : « études d'été » Decourtye et al, 2000 ; Inra de Bures	**NOEC = 48 ppb, LOEC = 96 ppb (NOEC= 16000 pg/ab ; LOEC = 32000pg/ab)**

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	**DL50 = 0,1 ppb (12pg/ab pendant 10jours)**
Dérivé urée Acide 6 chloronicotinique	M224, M231 : « Hive bees, Kling 2000	**NOEC>10 ppb (2740Pg/ab pendant 10 jours)**
	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)[2]	N°5 (mortalité > 40%)
Colin *et al.* (1998, M32, M115, M233, M238 seulement pour les essais sur la quantité de sirop ingérée et l'effet knockdown en oral et topique)[1,3]	N°6 (jeûne de 17h)
Kling (2000, M222)[2]	N°5 (mortalité > 20%)
Pham-Délègue et Tableau XXXIV (2000, M33 parties I et II, études d'hiver seulement)[2]	Rucher chauffé en hiver
Thompson (2000, M221, M226)[2]	N°5 (mortalité > 15%)
DeCourtye et Pham délègue (1998, M13, M32, M174) [1,2,3]	Rucher chauffé et problème de concentration

Etudes validées : 22

Etudes validées
Références
Armengaud *et al.* (2002, A36)[3]
Barth (2000, M220[1,3], M223[2], M227[2] seulement pour les abeilles d'intérieur)
Bruhnke (2000, M228)[2]
Belzunces et Suchail (2001, M53 partie I-4)[3]
Colin *et al.* (1998, M32, M115, M233, M238)[3]
Dresher (1990, M39)[3]
Guez *et al.* (2001; A31)[3]
Kirchner (1999 et 2000, M12 partie II et M14 partie II ou M40)[1,2]
Pham-Délègue et Tableau XXXIV (2000, M33 parties I et II, études d'été seulement)[2]
Schmitzer (1992, M135 et 1999, M6)[1]
Schmuck et Schöning (1999, M9)[1]
Thompson (2000, M218, M219)[3]
Wilhelmy (2000, M217[1], M225[2] seulement pour les abeilles d'intérieur et M229[2])

Etudes non évaluées	
Références	**Critères de non évaluation**
Kling (2000, M224)[2]	N°5 (pas de données)

[1] intoxication aiguë par voie orale; [2] intoxication chronique (10 à 12 jours) par voie orale ; [3] intoxication par voie topique

Synthèse des principaux résultats validés:

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

[1] intoxication aiguë par voie orale; [2] intoxication chronique (10 à 12 jours) par voie orale ; [3] intoxication par voie topique

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

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 *et al.* (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 *et al.* (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
Références
Ambolet *et al.* (1997, M158)
Colin et Cl (2000, M3, M114, M193)
Colin *et al.* (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)		
Effets observés	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 *et al.* (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 *et al.* (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)	
Effets observés	Imidaclopride	Oléfine
Danses tremblantes	NOEC=0,25	NOEC=0,25
Danses frétillantes	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*[10]. 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 $L(E)C_{50}$ (Lethal (efficient) Concentration50) ou NOEC (No Observed Effect Concentration) par un facteur d'incertitude. Ces facteurs ont été établis pour représenter les incertitudes suivantes :

[10] 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 $PNEC_{terrestre}$ (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 (adminsitration réitérée), soit des données de toxicité sublétale (suite à une ou plusieurs administration 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.

PNEC = 4/100 = 0,04 ng = 40 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 :

PNEC = 6,7 /100 = 0,067 ng = 67 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 parait 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 :

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

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 sublétale

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 sublétal, 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 réitérée 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 reflexe d'extension du proboscis, Decourtye et Pham Délègue, 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 reflexe 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 sublétal.

PNEC = 0,20 / 10 = 0,020 ng = 20 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 4-7jours 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 ng = 2 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 ng = 7,5 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 frétillantes 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 ng = 50 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
Toxicité aiguë				
DL50 48h = 4 ng/ab		Mortalité	100	40 pg/ab
Toxicité chronique par voie orale				
Abeilles adultes : DL50 10j = 0,012 ng/ab		Mortalité	10	1,2 pg/ab
Toxicité subléthale				
Laboratoire	**1 seul traitement par voie orale** NOEC = 0,94 ng/ab	Modifications comportementales	50	20 pg/ab
	traitement réitéré par voie orale NOEC = 0,2 ng/ab	Modifications comportementales	10	20 pg/ab
Sous tunnel	Sur nourrisseur LOEC = 0,075 ng/ab	Modifications comportementales	10	7,5 pg/ab
Plein champ	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
Toxicité aiguë				
DL50 = 6,7 ng/ab		Mortalité	100	67 pg/ab
Toxicité subléthale				
Laboratoire	**1 seul traitement par voie topique** 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 a 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 4ème et 5ème 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 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%	181
	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 tache, 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 a 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 entre1 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 cultural 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 cultural 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

Concentrations d'imidaclopride contenues dans le nectar = 1,9 (µg/kg ou ppb)		
		Quantités d'imidaclopride absorbé par les butineuses au cours de 12 heures
Pourcentages de nectar de tournesol contaminé par l'imidaclopride	**100%**	655
	80 %	524
	60 %	393
	40 %	262
	20 %	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, nourrissement du couvain (cas déjà traité), récolte et emmagasinage 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, nourrissement du couvain, récolte et emmagasinage 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 thermogenèse (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 réitérée 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					
Cas du pollen de tournesol					
Rapport PEC/PNEC	**PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen de fleurs contaminé (pg)**				
PNEC (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[11]					
1,2	33	67	101	134	151
A partir des données de toxicité sublétale 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

[11] On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée a 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					
Cas du pollen de maïs					
Rapport PEC/PNEC	**PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen contaminé (pg)**				
PNEC (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[12]					
1,2	35	70	105	140	151
A partir des données de toxicité sublétale 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.

[12] On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée a 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		
Cas du pollen de tournesol		
Rapport PEC/PNEC	**PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen contaminé (pg)**	
PNEC (pg)	10 mg de pollen ingéré **3,3**	45 mg de pollen ingéré **15**
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[13]		
1,2	2,7	12
A partir des données de toxicité sublétale 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 sublétale sous tunnel par voie orale		
7,5	0,44	2
A partir des données de toxicité sublétale 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		
Cas du pollen de maïs		
Rapport PEC/PNEC	**PEC Concentrations d'exposition en fonction de la quantité d'imidaclopride contenue dans le pollen contaminé (pg)**	
PNEC (pg)	10 mg de pollen ingéré **3,5**	45 mg de pollen ingéré **16**
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[13]		
1,2	2,9	13
A partir des données de toxicité sublétale 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 sublétale sous tunnel par voie orale		
7,5	0,63	2,1
A partir des données de toxicité sublétale plein champ par voie orale		
50	0,07	0,32

[13] On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée a partir de la DL50 de l'étude de Suchail.

Les évaluations à partir des données de toxicité sublétale 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%) **131**	(40 %) **262**	(60 %) **393**	(80 %) **524**	(100 %) **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[14]					
1,2	109	218	328	437	546
A partir des données de toxicité sublétale 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 sublétale sous tunnel par voie orale					
7,5	17	35	52	70	87
A partir des données de toxicité sublétale 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
Cas des abeilles adultes

[14] On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée a 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)**									
PNEC(pg)	**0,2 g de miel (0,5g de nectar)**					**0,8g de miel (2g de nectar)**				
	20% 190	**40% 380**	**60% 570**	**80% 760**	**100% 950**	**20% 760**	**40% 1520**	**60% 2280**	**80% 3040**	**100% 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[15]										
1,2	158	317	475	633	792	633	1266	1900	2533	3166
A partir des données de toxicité sublétale 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 confirmé 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

[15] On rappelle que la PNEC utilisée représente un cas extrême, elle est déterminée a 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

	Rapport PEC/PNEC selon le pourcentage de contamination des produits consommés		
Scénario	**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		**Absence de données :** - 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*)	**Absence de données :** - 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*)	**Scénario reposant sur une estimation** 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	**Absence de données :** - de dosages de résidus dans le miel stocké à la ruche **Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar**
Scénario 5 : consommation de miel par les abeilles d'intérieur	9,5 à 190 (3166*)	maïs = plante non nectarifère	**Absence de données** : -de dosages d'imidaclopride dans le miel -sur la stabilité de l'imidaclopride dans le miel lors de son stockage dans la ruche **Scénario reposant sur une seule analyse de résidus dans le nectar**

* 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 (dimethoate) comme référence (0,11µg/abeille<DL50<0,26 µg/abeille et 0,11µg/abeille<DL50>0,33 µg/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 tadem
- 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 µg/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.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Science of the Total Environment 376 (2007) 1 – 17
Science of the Total Environment
An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Humankind
www.elsevier.com/locate/scitotenv

Uncertainty: Cause or effect of stakeholders' debates? Analysis of a case study: The risk for honeybees of the insecticide Gaucho®

Laura Maxim [a,*], Jeroen P. van der Sluijs [b]

[a] UMR C3ED no 063 (IRD-UVSQ), Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 47 Boulevard Vauban, Guyancourt 78047 cedex, France
[b] Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation, Utrecht University, Heidelberglaan 2, 3584 CS Utrecht, The Netherlands

Received 24 June 2006; received in revised form 10 December 2006; accepted 31 December 2006
Available online 20 February 2007

Abstract

The social construction of uncertainty plays a major role in environmental decision-making. Methods for assessing this aspect of scientific knowledge quality are lacking. Our analysis of the French debate on the risk that the insecticide Gaucho® (active substance: imidacloprid) forms for honeybees is particularly relevant to this theoretical and practical gap. Based on our analysis, we propose six knowledge quality criteria that can assist in assessing the information communicated in an argumentative public process: reliability of the information – it must be based on all available scientific knowledge; robustness of the information – it must take into account criticism; use of the information produced by other stakeholders; relevancy of the arguments for issue under debate; logical coherence of the discourse; and legitimacy of the information source. Further, our findings deepen the understanding of the relationships between the social, economic, and institutional stakes of the actors involved in the debate and their strategies of 'creating uncertainty'. Finally, we compare the findings of this case study with the twelve lessons drafted by the European Environmental Agency (EEA) in its report *Late lessons from early warnings*, and we draft two more lessons. These lessons can be applied to future policy in order to minimize the repetition of past mistakes.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Uncertainty; Risk assessment; Pesticide; Gaucho®; Imidacloprid; Precaution

1. Introduction

The history of the governance of Gaucho®'s risk with regard to honeybees provides insight into the functioning patterns of the knowledge society. Based on an analysis of the French controversy on Gaucho®, this paper explores the relationships between the production and use of scientific knowledge and the socioeconomic stakes present in risk governance.

Empirical and theoretical studies on the role of science in risk governance challenge the view that scientific research informs policy by producing objective, valid, and reliable knowledge (Ravetz, 1971; Funtowicz and Ravetz, 1993; Wynne, 1992; Nowotny et al., 2001; Irwin, 2001; Walker et al., 2003; Funtowicz and Strand, in press). New scientific practices, coined post-normal science (Funtowicz and Ravetz, 1993), are now required in the context of hard political pressure, disputed values, high decision stakes, and major epistemological and ethical system uncertainties. The main features of post-normal science are the appropriate management of uncertainty, acknowledgment of the

* Corresponding author. Tel.: +33 1 39 25 53 61; fax: +33 1 39 25 53 00.
E-mail addresses: laura.maxim@c3ed.uvsq.fr (L. Maxim), J.P.vanderSluijs@chem.uu.nl (J.P. van der Sluijs).

0048-9697/$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.scitotenv.2006.12.052

plurality of problem perspectives, and the extension of the peer community to include non-scientific actors.

A further complication today is that more and more actors (industry, academia, NGOs, interest groups, non-scientific experts, investigative journalism, etc.) are producing knowledge relevant to risk decision-making. This makes it increasingly problematic to talk about 'science' (in general) and see its role as speaking 'truth' (the objective facts) to 'power' (decision-makers) (Wildavsky, 1979). Sociology of Scientific Knowledge (SSK) has shown that the social, economic, and institutional stakes that form the context in which knowledge is produced, used, and interpreted in discourses on risk governance are essential factors in understanding scientific controversies on risks (see, e.g., Jasanoff et al., 1995; Irwin, 2001). This constructivist view does not deny the importance of scientific evidence (Irwin, 2001), but stresses the key role that is played by the societal context in which the knowledge is produced and used.

The rationale of the present paper is that, in a situation of controversy and uncertainty about risk, the role of science can be strengthened by systematic critical reflection on both the scientific quality of risk evidence and the argumentative quality of the discourse which is intended to inform decision-makers. These two levels of quality are elaborated in the Structure and methodology section of this paper. The aim of the paper is to contribute to the development of tools for Knowledge Quality Assessment (henceforth KQA). These tools are essential for precautionary risk governance in order to achieve a timely and adequate policy response to early warnings of severe new risks (UNESCO, 2005; Van der Sluijs, 2007). In the same line, the European Environmental Agency (EEA) drafted twelve lessons (see Box 1) on precautionary risk governance, based on fourteen historic case studies (EEA, 2001).

The attention that scientific risk evidence receives from decision-makers strongly depends on the economic and social context in which the risk is identified (EEA, 2001). When the outcome of scientific risk assessment involves high economic and social stakes, the risk assessments can become tools for establishing the power balance in the political arena. We used the concept of 'uncertainty' to gain insight into the role of contextual factors in the quality of scientific evidence. Uncertainty here is understood in a broad sense. It refers to the situation that the body of evidence from scientific research is (perceived to be) inconclusive with regard to the magnitude and nature of adverse effects, the causal mechanisms, and the probability of a risk. Uncertainty has multiple dimensions: technical (inexactness), methodological (unreliability), epistemological (ignorance) and societal ((un)robustness) (Funtowicz and Ravetz, 1990). Tools available today (e.g., sensitivity analysis and Monte Carlo analysis; Saltelli et al., 2000, 2004) assess quantifiable dimensions of uncertainty (inexactness). In contrast, methods for the systematic assessment of qualitative uncertainty dimensions (such as value loading in knowledge production) are still in the early stages of development (Van der Sluijs, 1997, 2006; Kloprogge et al., 2005).

The dominant belief that inappropriate control of environmental risks is due only to insufficient scientific knowledge ignores the influence of political and societal contexts on risk governance (Wynne, 1992). Stakeholders can strategically use science in public

Box 1
Twelve 'late lessons from early warnings' (EEA, 2001)

A. "Broaden the Framing and Assumptions"

- Manage 'risk', 'uncertainty', and 'ignorance' [1]
- Identify/reduce 'blind spots' within disciplines [3]
- Assess/account for all pros and cons [6]
- Analyze/promote alternative options [7]
- Take account of stakeholder values [9]

B. "Broaden Assessment Information"

- Promote long-term monitoring/research [2]
- Identify/reduce interdisciplinary obstacles to learning [4]
- Identify/anticipate 'real-world' conditions [5]
- Use 'lay', local, and specialist knowledge [8]
- Ensure regulatory and informational independence[10]
- Identify/reduce institutional obstacles to learning [11]

C. "Act when there are reasonable grounds for concern"

- Avoid 'paralysis by analysis' [12]

The number between brackets refers to the numbering of lessons in the original EEA report.

debates (for example, by selecting information sources according to one's political agenda) and thus increase or distort scientific uncertainties (Hellström, 1996; Van der Sluijs, 1997, 2006). Moreover, the existence of contradictory expertise can be the result of a 'manufactured uncertainty', which is intended to favor the settling down and prolongation of the debate. This strategy can obstruct or delay decision-making and maintain an economic situation advantageous for certain stakeholders (Michaels, 2005). To explore the phenomenon of the social construction of uncertainty and its role in discourses on risk governance, this paper presents an in-depth analysis of the roles scientific evidence and social, economic, and institutional stakes have played in the vehement controversy in France over the past decade on the risks that Gaucho®, a systemic insecticide, forms for honeybees. This case is particularly interesting for the history of risk governance because it is the first time that the precautionary principle was applied in an environmental issue in France.

The central questions covered in this paper are:

- What is the relation between the strategy actors use to cope with uncertainty and their social, economic, and institutional stakes?
- What criteria are relevant for a systematic assessment of the quality of risk (scientific) evidence that is communicated in public controversies on risk governance?
- How does this case relate to the precautionary lessons (Box 1) listed in the *Late Lessons from Early Warnings* report (EEA, 2001)?

Systemic insecticides like Gaucho® (active substance: imidacloprid) comprise a new type of plant-protection product. They are employed in seed-dressing and/or soil treatment and disperse to all plant tissues during growth. This dispersal offers long-lasting protection to crops like sunflower and maize from pests including sucking insects and harmful soil insects (Elbert et al., 1991). It can, however, expose non-target insects like honeybees to the active substance through contaminated pollen and nectar. Moreover, the exposure of honeybees to imidacloprid is possible for long periods, especially during flowering (e.g., several weeks for sunflower and maize). The effects of the repeated consumption of contaminated pollen and nectar can appear either immediately or after several days or weeks (delayed effects), i.e., after they have first been stored inside the hive as pollen or honey. In this respect, systemic insecticides differ from the 'classic' sprayed insecticides, which are present on the plant for a shorter period (several hours or days after spraying).

Evidence of the risk caused by imidacloprid emerged when the substance's effects on honeybees were first studied in independent research (institutes and universities, funded by public money) in the late 1990s (for a compilation of results available at different points in time, see Scientific and Technical Committee for the Multifactor Study of the Honeybee Apiaries Decline, henceforth SCT, 2003). Political measures, however, were not taken until a long and vehement social debate enforced policy intervention. This debate involved beekeepers, Bayer (the company that produces Gaucho®), researchers, the French Ministry of Agriculture, farmers, and the civil society. This debate started in 1994 when beekeepers noticed symptoms that they had not previously observed: in several days of sunflower foraging, honeybee populations were suddenly and massively falling. The honeybees almost completely disappeared far from the hives or they were dying by the thousands in front of the hives. These mortalities were accompanied by behavioral symptoms specific for intoxication and by a 40–70% loss in sunflower honey yield (Abeilles/tournesol, 1997, 1998; GVA, 2006; Chambre d'Agriculture des Deux Sèvres, 2000; AFSSA, 2002; Alétru, 2003). Since Gaucho® was used for the first time in the treatment of sunflowers in 1994 and the symptoms were recorded for bees foraging Gaucho-treated crops, the beekeepers suspected a toxic effect of this product on honeybees. Consequently, they asked Bayer to inform them about the potential toxicity of the active substance for honeybees. This was the start of a long series of scientific studies involving experts from Bayer, the Ministry of Agriculture, beekeepers, and independent researchers. Some of the studies yielded arguments supporting and others refuting the causal link between seed-dressing with Gaucho® and the symptoms observed in honeybees. Still, other studies reported ambiguous findings.

The symptoms continued to be observed after 1994. Their regularity over the years, their specificity for bees foraging on sunflowers, and the geographical extent clearly differentiated them from symptoms observed before 1994 during accidental intoxications with sprayed pesticides. All of the studies undertaken by Bayer during this period reported that Gaucho® did not form a risk for honeybees.

This environmental problem quickly revealed social and economic dimensions: the sunflower honey harvest fell significantly and the economic status of many beekeepers was severely affected.

The combination of the research findings obtained by independent research (1998), social pressure, and media attention led to the first application of the precautionary principle for an environmental issue in France. In

January 1999, the Minister of Agriculture ordered a 2-year ban on the use of Gaucho® in sunflower seed-dressing. This ban was renewed in 2001 for 2 years and again in 2004 for 3 years. Bayer continued to state that the use of Gaucho® as a sunflower seed-dressing had no effect on honeybees (GVA, 2006; Parlement Wallon, 2004; Bayer Cropscience, 2006). The beekeepers and most of the media have accused Bayer of "*threats (…) and attempt of corruption*" (Libération, 9 October 2000), of dishonesty ("*Bayer attempted to cheat by presenting results that are not conform to the ones in the original reports a number of times to the Commission for Toxic Products*,[1]" (GVA, 2006)), and of reaping a profit at the cost of both the environment and public health. During that period, the Minister of Ecology and the civil society supported the beekeepers' arguments. The intoxication symptoms continued to be observed after the 1999 suspension of the use of Gaucho® in sunflowers. Two hypotheses were raised to explain this situation: (1) honeybees were still being exposed to the pollen of maize treated with Gaucho® and (2) imidacloprid persisted in the soils, i.e., the chemical was present in untreated crops growing in soil on which a seed-dressed crop had been grown one or several years earlier. In 2001, an interdisciplinary expert group, the Scientific and Technical Committee (SCT), was set up by the Ministry of Agriculture. Its objective was to assess the cause of the continuing decline in the number of honeybees.

Evidence confirming the risk that imidacloprid formed for honeybees accumulated from independent research in the years that followed. However, in 2003, the Minister of Agriculture decided not to ban the use of Gaucho® in maize seed-dressing. (Note: maize is one of the most economically important crops in France. Moreover, seed-dressing with Gaucho® significantly reduces the amount of work needed to protect the crop from insect pests, which makes the insecticide interesting to farmers.) Later that same year, the final report of the expert committee was published (SCT, 2003). It concluded that the risk imidacloprid formed for honeybees is worrisome, when Gaucho® is used to seed-dress sunflower and maize. Nevertheless, it was not until May 2004 that the Minister of Agriculture also banned the use of Gaucho® in maize seed-dressing. As an indication of the severity of the risk, the most recent risk assessment for honeybees collecting pollen from maize seed-dressed with imidacloprid, expressed as the ratio PEC/PNEC,[2] ranged between 500 and 600 (Bonmatin et al., 2005). Note that a ratio PEC/PNEC ≥ 1 is already equivalent to a risk (in this case, for honeybees).

Immediately after the Minister of Agriculture banned the use of Gaucho® on sunflower seeds, Bayer challenged the ministerial decision in the administrative court of Paris (March 1999). The case was passed onto the State Council (the highest administrative jurisdiction institution in France). About that time, several international consortia of seed producers (Monsanto, Novartis, Rhône-Poulenc, Pionneer, Maisadour, Limagrain) joined Bayer and formulated a similar case against the Minister's decision. The beekeepers, organized into the UNAF,[3] defended the Minister's decision in court. The State Council decided in favor of the beekeepers. Several other institutions were also called upon later to resolve the conflict: the Commission for the Access to Administrative Documents and courts all over France (where Bayer brought suit against several representatives of beekeepers' syndicates for discrediting Gaucho®).

The social tensions that accumulated during this ca. ten-year conflict are still present for two reasons. First, the position of Bayer has remained largely unchanged: "*… it is clear that seed-dressing products based on imidacloprid pose, at most, a very weak risk for honeybees*" (Bayer Cropscience, 2006). Second, imidacloprid is currently under evaluation by the EFSA (European Food Safety Authority) for inclusion on the list of active substances which may be marketed in the European Union.

2. Structure and methodology

The analysis of the Gaucho® controversy presented here comprises two interrelated parts. The first part (Section 3) analyzes the development of knowledge over time and the scientific controversies that emerged with regard to the risks evidence. The second part (Section 4) analyzes the economic, social, and environmental stakes underlying the stakeholders' discourses. These two sections address our first research question, i.e., what is the relation between the strategy the actors use to cope

[1] The 'Commission d'étude de la toxicité des produits anti-parasitaires à usage agricole et des produits assimilés, des matières fertilisantes et des supports de culture' is a body working with the Ministry of Agriculture, usually abbreviated 'Commission for Toxic Products' or 'ComTox', that is composed of experts in toxicology and eco-toxicology. This body is in charge of the entire range of pesticide products. ComTox is charged with analyzing the authorization dossier from toxicological and eco-toxicological points of view.

[2] Predicted Environmental Concentration/Predicted No Effect Concentration.

[3] UNAF (Union Nationale de l'Apiculture Française) is one of the three of French beekeeping syndicates, representing about 22 000 beekeepers.

with uncertainty and their social, economic, and institutional stakes. Section 5 discusses the results of the analyses and answers the second and third research questions: 'What criteria are relevant for a systematic assessment of the quality of risk (scientific) evidence that is communicated in public controversies on risk governance?' and 'How does this case relate to the precautionary lessons (see Box 1) listed in the *Late Lessons from Early Warnings* report?'. Finally, Section 6 summarizes the main conclusions of the paper.

Sections 3 and 4 are based on the idea that policy decisions made in a social context of scientific uncertainty and contradictory expertise are partly the result of the power play. In risk controversies, the 'winning discourse' plays a major role in determining how impacts are defined, how causes are established, and which solutions are chosen and implemented (Faucheux and Nöel, 1990). Analysis of scientific uncertainty and its management should include the sociopolitical context of stakeholders' actions. The paper, therefore, distinguishes two types of uncertainty (Van der Sluijs, 2006):

1. *Scientific uncertainty*, which may have both a quantitative (imprecision) and a qualitative (limitations of methods or incomplete state of knowledge) dimension.
2. *Social uncertainty*, which is determined by the quality of the expertise (directly related to competence, institutional dimensions such as the institutional affiliation, financial dependencies, and expert responsibility) and by the stakeholders' discursive strategies in selective use, framing, and interpretation of scientific evidence within the societal debate.

The framework used in Section 3 to analyze the scientific controversies distinguishes between (1) the accumulation of scientific evidence of risk over time and (2) the differences in significance that each element of the scientific evidence has for each of the stakeholders (beekeepers, Bayer, governmental departments, and independent research) in the social debate. The method used in this paper is discourse analysis. This type of analysis yields insight into the mechanisms that shape and frame social uncertainty and into the role of social uncertainty in risk governance.

Even if they do not share a single definition, discourse analysts agree that discourse is a form of language use that has to be studied in context (who uses language, how, why, and when) (Brown and Yule, 1983; Van Dijk, 1996, 1997a; Phillips and Hardy, 2002). In sociological tradition, our approach uses elements of critical discourse analysis (CDA), i.e., it analyzes "*real and often extended instances of social interaction which take a linguistic form, or a partially linguistic form*" (Fairclough and Wodak, 1997, p. 258). The CDA considers discourse as a form of 'social practice', whose description implies considerations about a two-way relationship: not only is the discursive event shaped by situations, institutions, and social structures, but it also shapes them. That is, the discourse constitutes the social identities and relationships between people and groups of people and contributes to their change (Fairclough, 1992; Fairclough and Wodak, 1997). According to Van Dijk (1997a,b), language users engaging in discourse accomplish social acts and participate in social interactions. The ideological loading of particular ways of using language and the relations of power that underlie them, however, are often unclear to people, particularly when the discourse is on scientific results whose understanding and comparative evaluation demands a high level of competence and a significant amount of time. The CDA, therefore, aims at making more visible these opaque aspects of discourse.

The arguments referring to science reflect a 'vision of the world' specific to each actor. To frame these constructivist aspects (i.e., 'social construction' of scientific knowledge), our method also includes the tradition of the 'argumentative discourse analysis' (ADA) and the 'analysis of controversies'. We applied the concept of social construction by identifying the social mechanisms (e.g., strategic selection of data and experts) by which stakeholders 'transform' the existing scientific evidence with the purpose of defending their own stakes.

ADA (Majone, 1989; Fischer and Forester, 1993; Hajer, 1995) combines the analysis of the discursive production of reality with the analysis of the sociopolitical practices from which social constructs emerge and in which the actors are engaged. The meaning of the scientific evidence in a given context is analyzed within the context of the particular social practices in which the discourse is produced.

The 'analysis of controversies' focuses on disputes, which highlight the social contradictions inherent in many decisions about science and technology, in order to describe the special interests, vital concerns, and hidden assumptions of various actors (Nelkin, 1992).

The present discourse analysis was based on about 400 written texts. These texts were selected with regard to the criterion of their purpose, i.e., the communication of one actor's position on the statement/action of another actor. They included speeches, press releases, documents of position made available through Internet sites (e.g., Apiservices – beekeepers' website, the website of the Ministry of Agriculture, the website of the State Council, the website of Bayer CropScience),

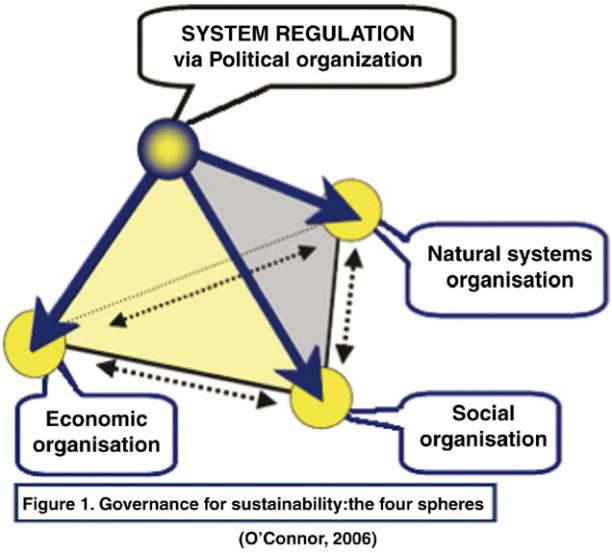


Fig. 1. Governance for sustainability: the four spheres.

decisions of the State Council, the Commission for Toxic Products, and the Ministry of Agriculture, meeting records, and newspaper articles. Because much of the conflict took place using communication tools largely available to the public, the Internet websites provided many documents. Unpublished documents were obtained directly from the respective actors.

The analysis in Section 3 was restricted to those documents that made reference to scientific results (58 texts). The parts of text that referred to the same scientific issue (e.g., the effect dose) were extracted and put into a comparative table (not shown but obtainable from the authors), whose columns were the actors of the debate and whose rows were the affirmation (citation) and the context in which the citation was produced. These citations were ordered chronologically. In this way, we could identify patterns in the discourses (that is, the 'scientific objects' evoked in Section 3) and points of divergence between the different actors with regard to the manner in which they addressed the 'scientific objects' in their discourses.

To compare the scientific evidence existent at a given time, we mainly used the report of the SCT. It presents an inventory of all scientific sources, methods, and results relevant to the risks for honeybees of imidacloprid used in seed-dressing until 2003.

For the analysis of the socioeconomic stakes (Section 4), we also used both scientific and 'grey' literature (e.g., an OECD report, an audit report for the beekeeping sector, and activity reports by Bayer).

The framework used for the analysis of the economic, social, and environmental stakes underlying the stakeholders' discourses (Section 4) is the so-called 'tetrahedron of the four spheres of sustainability' (O'Connor, 2006) (Fig. 1).

This tool, developed for the analysis of sustainability issues, highlights the interdependency between economic, social, and environmental dimensions. The economic sphere, often the principal focus of development policy discourses and indicators, depends for its viability on the vitality of the social and environmental spheres and, at the same time, affects them. Governance for sustainability, therefore, centers on the regulation of the economic sphere in relation to the two other spheres in order to assure the simultaneous respect for quality/performance goals pertaining to each of the three spheres and the respect of one sphere in relation to another (O'Connor, 2006). We focused on decision-making in a context of contradictory discourses. Our analysis was thus primarily looking at the political[4] arena, where arguments related to the environmental, social, and economic spheres are exchanged and sometimes collide. We studied the interfaces between the spheres of the tetrahedron: Policy–Economy (Section 4.1); Policy–Society (Section 4.2); Policy–Environment (Section 4.3); and the internal functioning of the Political sphere itself (Section 4.4). The analysis systematically looked at arguments

[4] In this case, the political arena is extended to the whole societal arena. The actors are not speaking (only) though the voices of their political representatives (as, for example, in Parliament), but directly influence the debate concerning the decision to be taken. Here, we can recognize one feature of the 'risk society' (Beck, 1992), which is the 'dissipation of the frontiers of politics'.

stemming from each of the three spheres (Economy, Society, and Environment) and investigated the roles and fates of these arguments in the decision-making dynamics within the political sphere. Note that non-human nature (Environmental sphere) does not voice demands directly in political forums. This sphere is represented by actors (e.g., Non-Governmental Organisations (NGOs)), who argue 'on behalf of the environment'.

The methodological starting point for Section 5 was that political decision-making on risks should be based on the full spectrum of the relevant knowledge available and should avoid biases in the knowledge base as much as possible (i.e., the highest quality knowledge available). The consequence of some discourses may be to boost the social debate, and even block decision-making, by creating a false image of contradictory arguments and no 'good science'. The conflict may be fuelled by the perception of some of the participants in the debate that the information transmitted by the discourses of others lacks quality, and consequently the latter's statements are unacceptable. In our analysis, we demonstrated the congruency (or lack of congruency) of the scientific evidence existing at a given time and the discourse of the actors involved referring to this scientific knowledge. We compared the scientific information communicated in the discourses of each actor with the scientific knowledge actually available at a given time to answer the question: was the scientific information communicated by this party the best scientific knowledge available at that time? We identified the reasons for the failures to express the best scientific knowledge in discourse. These reasons led to a lack of mutual acceptability, among the actors, of statements referring to scientific knowledge. They were expressed by the actors themselves in the debate. We organized these reasons into six criteria of quality (see Section 5).

These criteria are intended to counteract the biases in the knowledge base that emerge during stakeholders play and assure that each actor strives to communicate (and argue for one or another demand to decision-makers) on the basis of the highest quality knowledge available. Based on this argument, we argue that they represent criteria for the 'social quality' of the scientific knowledge.[5]

[5] In this respect, our methodological background relates to Habermas's concept of 'discourse ethics' (Habermas, 1984, 1987), which was further developed by Webler (1995) in his set of criteria for evaluating communicative action. We have not, however, discussed these criteria, because our approach is more focused in object, developing criteria of quality that are specific to the process of communication of the scientific knowledge.

3. How was scientific evidence of risk reflected in the stakeholders' discourses?

We clustered our findings into five groups: research hypothesis and the methods employed; honeybee exposure to imidacloprid; the lowest effect concentration; properties of imidacloprid: persistency in soils and presence in untreated crops; and impacts on non-target organisms and on the environment. They are discussed below.

3.1. Research hypothesis and methods employed

The regulatory procedure to assess the risk that sprayed ('classic') pesticides form for honeybees is based on acute toxicity (LD_{50}).[6] This value is then used to calculate a hazard quotient (HQ) (Rortais et al., 2005). The authorization dossier needed for marketing imidacloprid also contained only this indicator. This methodology for risk assessment, based on the idea of dose (of pesticide) per hectare, is not, however, appropriate in the case of systemic insecticides (GVA, 2006; Arnold, in AFSSA, 2002; SCT, 2003; Rortais et al., 2005; Halm et al., 2006), because it cannot account for many elements of toxicity that are highly important in the case of honeybees: chronic toxicity (Suchail et al., 2003), sublethal effects, and effects on the whole colony. If the risk assessment procedure commonly employed for pesticides is used, it is possible that new products will be falsely declared environmentally sound. The procedure of risk assessment chosen by the SCT for imidacloprid was based on the evaluation of the ratio PEC/PNEC (SCT, 2003). Because French authorization procedures did not utilize new research insights, this discrepancy between regulatory demands and scientific understanding still exists. Other hypotheses which are valid for sprayed pesticides but not for this new type of insecticide, have been equally questioned: the dose–effect relationship (Narbonne, in AFSSA, 2002; Suchail et al., 2003); the measure of honeybee intoxication by counting the numbers of dead honeybees in front of the hives (GVA, 2006); and the use of the employment dose to measure the effects of systemic insecticides (GVA, 2006).

3.2. Honeybee exposure to imidacloprid

[1994]

Bayer claimed that imidacloprid applied on seeds cannot be present in flowers, because it disappears

[6] Lethal Dose 50: the dose that causes the death of 50% of the exposed individuals.

before the treated plants flower (GVA, 2006; AFSSA, 2002). The consistent association between the use of Gaucho® in treating sunflowers and the appearance of intoxication symptoms during sunflower foraging, however, led *beekeepers* to suspect the presence of the substance in those parts of the plant utilized by honeybees. Based just on Bayer's dossier, the *Commission for Toxic Products* did not take into consideration all of the potential effects on honeybees before they granted marketing authorization.

[1995–1997]

All of *Bayer*'s studies concluded that Gaucho® used in sunflower seed-dressing is harmless for honeybees (GVA, 2006; Curé in AFSSA, 2002). However, the significant lack of quality in Bayer's studies was repeatedly demonstrated by *independent scientists*. *Beekeepers* and local/departmental state services also carried out field studies and showed the occurrence of symptoms in areas of extended monocultures seed-dressed with Gaucho® and the absence of other potential causes (Direction des Services Vétérinaires de la Vendée, le 29 septembre 1997; Chambre d'Agriculture de la Vendée, FDSEA de la Vendée, FDSEA des Deux Sèvres, 1999). The conclusion of the *Commission for Toxic Products* (11 December 1997), based on its first expertise report (Belzunces and Tasei, 1997), was ambiguous. Given the information available, the Commission said that it is not possible to conclude whether or not a causal link exists between the use of Gaucho® and the decline of honey yield found in certain regions.

[1998–1999]

The studies undertaken by *Bayer* during this period either could not detect imidacloprid or detected it, but could not quantify it (GVA, 2006; SCT, 2003). One exception was a laboratory study that quantified the substance in sunflowers treated with Gaucho® to be 3.3 ppb in pollen and 1.9 ppb in nectar (Stork, 1999, in GVA, 2006; SCT, 2003). According to Bayer, the results of field experiments would either prove or disprove the risk of an active substance, even if they did not confirm the results obtained in laboratory studies. The *State Council*, however, decided that the risk can be assessed if it is based on the results of both field experiments and laboratory studies. Reviews of Bayer's studies, conducted by *independent scientists* (honeybee specialists) showed major deficiencies, in particular a lack of scrupulosity: for example, inadequate experimental conditions (e.g., colony dimensions unrepresentative for the normal conditions of colony development, insufficient time allowed to observe foraging behavior); incorrect use of scientific terms (e.g., 'Chinese honeybee' is a term without scientific relevance); imprecise measurement methods; and deficient presentation of the results (e.g., lacking statistical tests, lack of replication, hazardous interpretation, laboratories are not named) (Arnold, in AFSSA, 2002; SCT, 2003). The first independent research program (INRA, CNRS and AFSSA, 1998) identified the presence of imidacloprid in plants during flowering and abnormal honeybee behavior at both treated and control sites. This last finding led the researchers to address the problem of imidacloprid's persistence in soils and its presence in untreated crops cultivated in soils previously used for treated crops (Bonmatin et al., 2000). The analytical techniques available at that time allowed the detection of imidacloprid, but not its quantification below 10 ppb. Throughout this period, *beekeepers* summarized the results of the studies conducted by Bayer, the Ministry of Agriculture, and independent research institutes and compared them with their own field observations. The beekeepers' objective was to make the results public in order to show the congruity of their own observations and the scientific results and to mobilize the civil society for support. The conclusion of the *Commission for Toxic Products* was ambiguous: the data examined did not allow the conclusion of an unquestionable effect of imidacloprid or its metabolites on honeybees or honey yield, nor did it totally exclude the effect of imidacloprid and its metabolites. Consequently, the Commission reported that additional studies are necessary (16 December 1998).

[2000–2004]

Bayer received precise results during this period (3.3 ppb in sunflower pollen and 1.9 ppb in nectar (Stork, 1999, in SCT, 2003)). Nevertheless, the company reported "*an exposure between 0 and 5 ppb*" (Curé, in AFSSA, 2002, p. 32). The value of 5 ppb is the quantification limit declared by Bayer for the dosage of imidacloprid in Gaucho®-treated sunflowers and maize. We, however, showed that Bayer had already obtained lower measurements (using radioactivity-based methods). In view of the relevancy of the existing knowledge, this 'semantic slip' blurs the message by strategically selecting among the measurements available. The underlying effect of this linguistic construct is to suggest imprecision: "*in certain cases, the analysis revealed the presence of a residue, but only below the*

quantification limit" (Curé, in AFSSA, 2002, p. 32). Moreover, *independent research* had already reported (two years before) available quantification and detection limits well below those used by Bayer: quantification limit at 1 ppb (pollen and nectar) and a detection limit at 0.3 ppb for pollen (Bonmatin, 2001, in SCT, 2003) and 0.8 for nectar (Lagarde, 2000, in SCT, 2003). Imidacloprid was measured in the pollen of sunflowers and maize in concentrations between 2 and 4 ppb. *Beekeepers* systematically present these results in order to assure transparency and to gain public credibility. In 2001, they summarized in detail the existing studies (GVA, 2006) and concluded: "*in semi-controlled and controlled conditions, harmful effects are observed for concentrations strictly of the same magnitude as those which the honeybee inevitably encounters in the field during sunflower and maize flowering*" (21 January 2001, www.beekeeping.com). Among the available results, the *Commission for Toxic Products* selected a measurement of 2–3 ppb for the imidacloprid present in the pollen and nectar of Gaucho®-treated sunflowers. The argument that the Minister of Agriculture used for not banning the use of Gaucho® in maize seed-dressing (February 2001), however, was that honeybees do not consume maize pollen. The scientific error contained in this conclusion was reconsidered the next year (September 2002) by the State Council, which consequently advised the Minister to reconsider his decision. The values validated by the SCT were 3.3 ppb and 3.5 ppb in the pollen of Gaucho®-treated sunflowers and maize, respectively, and 1.9 ppb in the nectar of Gaucho®-treated sunflowers. Recently published results of a survey initiated in French apiaries to monitor the weakness of honeybee colonies showed that imidacloprid had become a common contaminant of the environment (the most frequently found residue was imidacloprid: in 49.4% of the samples) (Chauzat et al., 2006).

3.3. The lowest effect concentration

[1997–2002]

In 1997, *Bayer* declared that the first biological effects appear at 5000 ppb. Two years later, however, the LOEC (lowest observed effect concentration) value identified by a Bayer study was well below this value: 0.5–7 ng/honeybee (20 ppb) (Kirchner, 1999, in SCT, 2003). In 2000, sublethal effects were identified at very low doses (0.075–0.21 ng/honeybee, i.e., 3 ppb in a solution containing imidacloprid) by scientists working in *independent research* (Colin and Bonmatin, 2000, in SCT, 2003). These researchers concluded that the environmental soundness of imidacloprid "*is necessarily arguable*" (Bonmatin et al., 2000). From the available results, the *Commission for Toxic Products* selected 12 ppb as the lowest effect dose. *Beekeepers* have continued to present the results of independent research, emphasizing that doses as low as 3 ppb and 6 ppb affect honeybees (GVA, 2006).

[2002–2003]

Bayer claimed that the lowest effect dose is 20 ppb, but failed to mention that this result was obtained during an open-field study. Thus, the company stated that for the studies "*made on complete colonies in the open field… the first negative effects are not observed at 20 ppb. The first observed effect of imidacloprid is a refusal to feed from the contaminated source and thus the end of foraging*" (Curé, in AFSSA, 2002, p. 32). This claim inadequately reflects the results of the respective study (Kirchner, 1999, 2000, in SCT, 2003), in which the effects observed in the open field, and caused by 0.5–1.4 ng/honeybee (20 ppb), were not the refusal of feeding, but a decrease in the frequency of wagging dances (which is correlated to recruitment in the colony for a food source), a change in dance precision (concerning the direction), and the occurrence of trembling dances (which is an inhibiting behavior for foraging recruitment and often observed in intoxicated bees) (Kirchner, 1999, 2000, in SCT, 2003). This contradiction can be attributed either to Bayer's inability to interpret the results of the study or to strategic behavior on the part of Bayer. One of Bayer's main arguments for claiming the absence of effects of Gaucho® on honeybees was that field experiments do not confirm the symptoms observed by the beekeepers (Curé, in AFSSA, 2002; Tossen, in Parlement Wallon, 2004; Bayer Cropscience, 2006). The studies available during this period and *validated later by the SCT* recorded measurements well below those reported by Bayer, for both laboratory and tunnel or flight-room studies. A number of studies reported the following sublethal effects for imidacloprid: 0.075–0.21 ng/honeybee (3 ppb); 0.15–0.42 ng/honeybee (6 ppb); 0.25–0.7 ng/honeybee (10 ppb), and 0.31–0.87 ng/honeybee (12.5 ppb) (Colin, 1998; Colin and Bonmatin, 2000; Decourtye and Pham Délegue, 1998; Pham Délegue and Decourtye, 2000; in SCT, 2003). Based on the results produced by independent research, the *beekeepers* supplied arguments in

support of their demand to ban the use of Gaucho®. Three of the available results for the effect dose of imidacloprid were validated in 2002 by the *Commission for Toxic Products* and ranged from 0.15 ng/honeybee (laboratory) to 7 ng/honeybee (open field).

3.4. Properties of imidacloprid: persistency in soils and presence in untreated crops

[1994]

Even though its half-life greatly exceeded European norms, Gaucho® was authorized for marketing.

[1997]

The *Commission for Toxic Products* confirmed the half-life of imidacloprid to be 2–3 times longer than the one accepted by European norms (Belzunces and Tasei, 1997). The French jurisprudence,[7] however, stated that, despite its half-life in the soil, a substance may be authorized if it is "*scientifically proven that, in the relevant field conditions, the accumulation in the soil is insufficient to cause an unacceptable level of residues in the following crops, and that there is neither unacceptable phytotoxic effect for the following crops, nor unacceptable effect on the non-target species*." In this case, the benefit of the doubt with regard to the lack of precision of what 'acceptability' means was to Bayer's advantage, not that of the environment.

[1998–2001]

Results obtained in 2000 showed the persistency of imidacloprid in soils and its presence in untreated crops growing on soils where a crop treated with Gaucho® had been previously grown (SCT, 2003). Assessment of the available documentation led the *Coordination of French Beekeepers*[8] (GVA, 2006) to conclude that the substance is found in amounts of ~10 ppb in soils (the year of treatment). Subsequently untreated crops absorbed the chemical in concentrations comparable to those present in the treated crops.

[2003]

The scientific evidence validated by the SCT confirmed the presence of imidacloprid in soils that were used for crops seed-dressed with Gaucho®. The average levels found were 10.25 ppb the year of treatment and 4.4 ppb the year following the Gaucho®-treated crop (SCT, 2003).

3.5. Impacts on non-target organisms and on the environment

Bayer judged the risks that imidacloprid forms for the environment to be either nonexistent or 'acceptable' (Bayer, 2001). *Available scientific knowledge*, however, indicated negative effects on other insects (including pollinators), birds, and aquatic organisms. Both *researchers* and *beekeepers* insist that the honeybee, in this case, represents a bioindicator for the state of the environment. The Minister of Ecology also held imidacloprid responsible for the bird intoxication observed in France after 1995 (GVA, 2006). Imidacloprid authorization data in several countries has shown different toxicity levels for birds, pollinating insects (particularly honeybees), fish and other aquatic organisms, and mammals (pesticides authorization registers for Portugal, Belgium, Spain, Canada, and the United States, websites visited in January 2006).

4. Social, economic, environmental, and institutional stakes underlying stakeholders discourses

4.1. The interface between policy and economy. Stakes for the regulation of the economy

The *chemical industry* has increased its global sales tenfold since 1970, and the OECD scenarios for the year 2020 anticipate a continuation of this trend. Presently, it is the third-most important economic sector in the world. The European chemical industry holds the first place in this sector, followed by that of the USA. Last years' strategy of the chemical industry was to transfer the production of basic substances to non-OECD countries and focus, in Europe, on specialty products (agrochemistry, pharmacy, biotechnologies, etc.) (OECD, 2001). The winners on the European market will, therefore, be the ones having a high innovative capacity. New active substances have to be marketed as quickly as possible, particularly in the field of agrochemistry. Risk assessment of 'new substances' before marketing, however, has classified about 70% of them as dangerous (Donkers, 2005). The French agrochemical industry has an important position both as the producer and as the seller of pesticides, because France is the number one European consumer of these substances.

The strategic behavior of the agrochemical industry is determined both by these economic factors and by the regulatory environment. The Directive 91/414/EEC stipulated a reassessment of the active substances contained in plant-protection products already on the

[7] Arrêté du Ministre de l'Agriculture de 6 septembre 1994.

[8] The Coordination of French Beekeepers (Coordination des Apiculteurs de France) represented the interests of all three national beekeeping syndicates.

market in the EU at the starting date of the directive. The industry responded to this directive by developing a new generation of plant-protection products (neonicotinoids, including imidacloprid and phenylpyrazols). Since the risk-assessment procedure proposed by the directive is inappropriate for these new insecticides, these substances may receive market authorization despite their potential environmental risks. This, therefore, may provide the respective companies with the competitive advantage of fast market introduction (see Section 3).

Another aspect of the industrial strategy relates to the alliances between big companies in order to control specific market shares. An important part of global production is assured by the number of multinationals inside the chemical industry and the tendency is still towards mergers (OECD, 2001). Size has become essential for profitability, i.e., to absorb growing research and development costs. Total average expenditures for the development of a new product are about 50 million US dollars (Assouline and Joly, 2001). The benefits with regard to systemic insecticides largely justify the investment. One example is Régent TS® (active substance: fipronil): sales of this systemic insecticide earned 122 million euros for Aventis CropScience in 1998 alone (Hicks, 2000). Similarly, insecticides containing imidacloprid are among those sold the most globally. Financial investments are also accompanied by investments in partnerships with seed producers and distribution networks.

Through the merger of Rhône-Poulenc with Hoechst, the newborn Aventis became number one on the global insecticide market (with a share of 17%) and the European leader in plant-protection products (24% of the market) (Hicks, 2000). Its agrochemical division was sold to Bayer in 2002. The financial importance of imidacloprid for Bayer is immense: in 1998, sales of the four pesticides containing imidacloprid reached 800 million DM. In 2005, France was the number one European market for Bayer CropScience Monde and number three globally (www.bayer.fr).

4.1.1. Farmers and seeders

In France, the maize seed branch generates an annual turnover of about 650 million euros. This makes maize the number one crop in the country and France the European leader of maize production and the primary global exporter (Maïz'Europ', 2006). The agricultural sector has since been divided by the two sides of the debate: syndicates representing intensive agriculture have joined forces, with regard to interests and arguments, with agrochemical companies, while the syndicate *La Confédération Paysanne* supports the honeybee's role as bioindicator, the high economic stake represented by pollination by bees, and the need of a partnership between farmers and beekeepers.

4.1.2. Beekeeping sector

In 1994, the French *beekeeping sector* consisted of 1 370 220 beehives and 84 800 beekeepers. In 2004, there were 1 360 973 beehives, but 15 200 fewer beekeepers (GEM-ONIFLHOR, 2005). Because of the decrease in the average yield/hive and the increase in colony mortality during this period, beekeepers had to increase the number of hives per exploitation in order to compensate for their losses. The apparent stability of the number of hives between 1994 and 2004 does not correctly portray this replacement of lost hives. Many small producers (i.e., those owning less than 70 beehives) were unable to cover their losses and had to abandon beekeeping.

Until 1994, a stable productivity had allowed French beekeepers to face the competition with imported honey. Severe losses in the yield of sunflower honey started in 1995 (Coopérative France Miel, in GVA, 2006). The statistics indicated a strongly decreasing tendency (−46%) in sunflower honey yield between 1992 and 1999 for the French regions Deux-Sèvres and Charentes et Poitou (GVA, 2006). In addition, an audit of the beekeeping sector showed a decrease of 3000–4000 tons of honey on the national level between 1997 and 2004 (GEM-ONIFLHOR, 2005). Added to these losses, i.e., losses due to the replacement of hives and the decrease in honey production, were the expenses made for research (beekeepers were contributing their financial resources from the European support to beekeeping, which are normally meant to develop the sector, to research programs assessing the risk of Gaucho®). Additional expenses, including attorney fees, were incurred when the debate went to court.

4.2. The interface between policy and society. Stakes to assure environmental justice

The press often highlighted the unequal power of the two 'discourse coalitions' involved in the debate to influence decision-making: one side comprised the French agricultural sector, the number one chemical industry in Europe, the chief branch of European seed-producers, and the goodwill of the Ministry of Agriculture, while the other was made up of honeybees, beekeepers, researchers, and the civil society. The response strategy of the beekeeping sector was characterized by cohesion inside the group (among the different syndicates) and extreme assiduity. The sector's excellent communication strategy, focused on logic and scientific arguments, favored the visibility of the stakes involved. Moreover, the sector

received support from the civil society, not only because the financial status of the beekeepers has been severely affected, but also because their stakes were human, relating to dignity and social recognition. They affirmed the right to reject decisions that concerned them but in which they were not involved and refused to allow priority to be given in decision-making to the criterion 'economic weight' to the disadvantage of 'equity'.

4.3. The interface between policy and environment. Stakes for the implementation of environmental policies

In a letter published in Le Point on November 21, 2003, Yves Schenfeigel, head of the Bureau for the Regulation of Pesticide Products (Ministry of Agriculture), revealed the failure of the administration to assure the efficiency of the authorization process: "*three public servants for dealing with 20000 demands of authorization per year, a joint management of the risk assessment with industrials, lack of transparency in the procedures… in the field of risk assessment, the domain of pesticide residues in aliments is insufficiently covered*." In consequence, "*it is impossible for the bureau to accomplish its missions*". This fact may explain why the authorizing body failed to adequately evaluate the indices of the potential risk of imidacloprid contained in the authorization dossier (the LD_{50} was among the lowest known, the half-life in soils was very high). Moreover, the Ministry of Agriculture was in a conflict-of-interest situation because it was simultaneously responsible for two sectors that often have contradictory demands (beekeeping and agriculture). The French Committee of Prevention and Precaution confirmed this in 2002 by showing the need for changing the patterns of managing pesticides' risks to health and the environment (Comité de prévention et de la Précaution, 2002).

4.4. The internal functioning of the political sphere. Stakes with regard to the ability of the political system to perform the arbitrage between social, economic, and environmental spheres

During the Gaucho® debate, the attitude of the French governmental departments oscillated between opacity (refusal to release public documents), hesitation (contradictory or ambiguous statements), and open negation of the statements of researchers and beekeepers. This enhanced the mistrust of the beekeepers and the civil society, who then accused the government of a technocratic approach to expertise, incompetence, and favoritism towards the agrochemical companies (AFSSA, 2002; GVA, 2006). The concerns of these two groups were justified in January 2000: despite the manifold results issuing from independent research that established the harmful character of imidacloprid for honeybees, the Minister of Agriculture renewed Gaucho®'s authorization for 10 years. Moreover, this occurred during the period when the annulment procedure of this authorization was before the State Council.

5. Discussion

The present case study showed that, even when the scientific evidence of the risks was strong, stakeholders still attempted to influence the interpretation of the evidence, and as a consequence political decision-making, in their best interest. This confirms the constructivist view that science is colored by the context in which it is produced.

The second research question of this study comprised methodological aspects of assessing the quality of information. Social aspects of uncertainty play a crucial role in decision-making. However, within the new field of knowledge quality assessment, methods for the evaluation of social uncertainty are still in an early phase of development (Van der Sluijs, 2006). The results of the present study could be a starting point for further research in this field, because they allowed us to formalize six criteria for the quality of information communicated in an argumentative policy process. These criteria are discussed below.

5.1. Reliability of the information – it must be based on all available scientific knowledge

When uncertainty is at the heart of a social debate and knowledge is being sought to support that debate, it is vital that all statements weigh the most recent information found and include findings from scientific sources other than the actor's own expertise. Arguing from an epistemological point of view stresses the key importance of what Dunn (2001) called 'context validation', i.e., the information used in decision-making should cover the complete set of relevant knowledge present in a particular policy context. In other words, the scope of the knowledge considered must be broadened in order to minimize the possibility that important aspects are overlooked (see Section 3).

In the present case, many of the pesticide producer's conclusions were the result of a stake-driven selection of the results made available by experts, without scientific criteria for validating the choice made. For the non-expert audience (the general public and policy-makers), these arguments may seem as valid as any issuing from scientific work. For the independent researchers,

however, the scientific quality of several of Bayer's conclusions was highly arguable. The selective use of knowledge can be legitimate only as long as it is clear what information has been omitted and why, following a process of review and argued selection, that information is considered less relevant to the case.

5.2. Robustness of the information – it must take into account criticism

The 'experts' contradictions', which were so often evoked during the years of the Gaucho® debate, were due partly to the lack of standardized procedures (SCT, 2003) and partly to the failures of communication between the scientific community and the regulatory bodies. About 20 years before the Gaucho® debate, researchers had already started reporting that LD_{50} alone was not sufficient to study the risk that pesticides form for honeybees (AFSSA, 2002). These warnings were ignored by the French government. Similar cases included asbestos and mad cow disease: decision-makers also ignored the signals coming from scientists (EEA, 2001).

5.3. Use of the information produced by other stakeholders

The use of information produced by all stakeholders in the construction and assessment of the knowledge used for decision-making is vital in the management of social processes associated with environmental risks. Stakeholders can contribute to knowledge production in a number of ways: for example, by contributing knowledge on local conditions (e.g., the consistent association between sunflower foraging and symptoms) which may help determine which data are strong and relevant and which symptoms require further investigation (e.g., symptoms observed by beekeepers caused independent research to address specific target points of honeybee intoxication); by providing personal observations which may lead to new foci for empirical research addressing dimensions of the problem that were previously overlooked (e.g., exposure pathways via pollen and nectar were deemed impossible before beekeepers reported intoxication symptoms); by identifying new indicators that better match the problem as experienced by the stakeholders (e.g., beekeepers' observations led to including chronic sublethal effects in the assessment of risk); by thinking creatively about the mechanisms and hypotheses regarding the causal links between observed symptoms and possible causes (e.g., persistency in soils may explain the intoxication seen in bees foraging on untreated crops); and by scrutinizing and improving assumptions made in risk assessments so that they better match real-life conditions (e.g., Bayer's field studies ignored the fact that the diet of intoxicated honeybees was dictated by the several square kilometers of sunflower monoculture: i.e., it provided very little or no alternative diet. The honeybees in Bayer's field experiments had an alternative diet within their range of flight). By ignoring local beekeepers' knowledge and by repeatedly displaying an ambiguous attitude, the French Ministry of Agriculture repeated previous history of mismanaged environmental problems and contributed to the reinforcement of the conflict (De Marchi and Ravetz, 1999; EEA, 2001). By means of press releases and demonstrations, beekeepers systematically called for the application of the precautionary principle, because the wait for conclusive evidence on imidacloprid intoxication was severely affecting their livelihood.

5.4. Relevance of the arguments for issue under debate

The information communicated in an argumentative exchange must be relevant for the subject discussed. Some arguments, however, may try to displace the focus of the debate to completely different contexts or issues. For example, Bayer's conclusion regarding the absence of any risk of imidacloprid for honeybees made no reference to the relevance of the results obtained "*in different regions of the world*" (Bayer Cropscience, 2006), neither for large-scale sunflower and maize monocultures, nor for the specific situation in France.

5.5. Logical coherence of the discourse

The absence of internal contradictions in a discourse is vital for mutual trust among the stakeholders and is an essential factor for successful risk governance. For example, the findings of the SCT report, presented by Hervé Tossen to the Walloon Parliament, were as follows: "*The report of the Scientific and Technical Committee in France is the first of the three steps of the multifactor study and consists of a new review of the existing data. No new information concerning the use of Gaucho® on sunflowers and maize emerged from the Committee's report*". Compared to previous studies, however, this SCT report was the first to clearly demonstrate the risk imidacloprid, used in sunflower and maize seed-dressing, forms for honeybees. Hervé Tossen added: "*The researches and intensive studies realized by independent institutes and by Bayer confirm that Gaucho® is safe for honeybees. […] For maize, risk assessment was carried out and also concluded that there was no risk*" (Parlement Wallon, 2004, p. 13). It is

clear that the results of the SCT report and Bayer's conclusions are contradictory. Once acknowledged, this type of language trick, often called a 'semantic slip' by the beekeepers during the debates, discredits the stakeholder who uses it and significantly reduces his/her opportunities for meaningful communication with the other stakeholders.

5.6. Legitimacy of the information source

The responsibility, impartiality, and independency of Bayer researchers have often been questioned by the independent researchers. In fact, they signaled procedural errors, incorrect reasoning, and a lack of understanding of honeybee biology. Moreover, the case of the systemic insecticide Gaucho® raised questions about the choice of experts working in expert committees, that represent a certain institution, with regard to their freedom, independence, and competence. In the case of imidacloprid authorization, for example, not one of the 50 members of the Committee for Toxic Products was a honeybee specialist and these specialists were under-represented in the Honeybee Working Group set up by the Committee. This definitely limited the ability of the Committee to judge on honeybee issues.

The study's third question addressed the lessons that can be drawn for the future governance of similar risks. Many of the EEA's twelve 'late' lessons (see Box 1) were ignored in the political process described above, including lesson 2 "*Provide adequate long-term environmental and health monitoring and research into early warnings*" (EEA, 2001, p. 168). From 1994 to 2004, the symptoms described by beekeepers were confirmed by different local/regional governmental services. These reports, however, were ad hoc and were never compiled at the national level for more than two years in a row. The Ministry of Agriculture repeatedly failed to run a workable monitoring network, which helped undermine the trust of the other actors and fuel the conflict.

As for EEA lessons 5 "*Ensure that real world conditions are adequately accounted for in regulatory appraisal*" and 8 "*Ensure the use of 'lay' and local knowledge, as well as relevant specialist expertise in the appraisal*" (EEA, 2001, p. 169), the declaration of one beekeeper is illustrative of how the process of expertise was experienced by the local actors: "*it is enough to come to the field. One hundred percent of those who came to the field were convinced. It is regrettable that we never saw those of the individuals who are making the decisions at this moment in their offices, or even some researchers who are members of certain important Committees and Commissions – them, we never saw them*" (Frank Alétru, in Elie and Garaud, 2003). Excluded from the process of gathering knowledge on the problem, but nevertheless suffering from the damaging effects of the delays in decision-making, the beekeepers often criticized the slowness of the analyses ('paralysis by analysis') and the diversion of research towards too 'complex' subjects. Our case study reinforces, therefore, EEA's lesson 12, which recommends that policy-makers "*avoid 'paralysis by analysis' by acting to reduce potential harm when there are reasonable grounds for concern*" (EEA, 2001, p. 169).

The Ministry of Agriculture quickly initiated scientific studies after the Gaucho® problem became an issue of public debate. If it had been followed, the third EEA lesson ("*Identify and work to reduce 'blind spots' and gaps in scientific knowledge*") could have been fruitful. The ambiguity of the Ministry's public statements and the discrepancy between its conclusions and the results from independent research, however, raised important criticism on the purpose and the transparency of the official initiative. This result strengthens the focus on relevant specialist expertise noted in lesson 8. In other words, *assure the independency and competence for the given issue of the experts that you appoint as well as the complete transparency of the research process and the public availability of the results. Explain the reasons for your decisions regarding the choice and framing of the research programs and how they answer the demands of those concerned*.

The mad cow disease crisis, one of the EEA's fourteen case studies, caused an institutional restructuring in the UK. The British Ministry of Agriculture failed in both its missions, i.e., consumer protection and the defense of farmers' interests. As a consequence, the manner in which risks were assessed and managed in the UK changed and the Food Standards Agency was created. Insights from that case inspired lesson 10, which recommends the "*maintenance of the regulatory independence of interested parties while retaining an inclusive approach to information and opinion gathering*" (EEA, 2001, p. 169). In the present French case, the Ministry of Agriculture was also subject to a conflict of interests since it was responsible for both the interests of the agricultural sector and the management of risks issuing from that sector's activity. This resulted in the ambiguous attitude of the governmental bodies (see Section 4.4). It can be concluded, therefore, that *the responsibility for the management of risks associated with the activities of one sector should not be a task of a governmental body that is also responsible for the economic interests of that same sector*.

The present analysis also resulted in two more lessons on risk governance. First, it is a pitfall to assume that existing methods for dealing with the risks of existing technologies are also appropriate for dealing with new risks coming from new technologies. In the present case, the tools were not fit for the function for which they were used. Even though the nature of the risk posed by systemic pesticides was radically different from the one associated with sprayed insecticides, the same assessment tools (LD_{50}, respectively HQ) were used. Consequently, their use delayed the recognition of the risks imidacloprid formed for honeybees. This lesson can be composed as follows: *When dealing with the risks of new technologies, verify whether the methods available for their assessment are appropriate.*

Second, it is a pitfall to underestimate the problems related to the means and efforts needed to implement policies. The case of Gaucho® revealed the failure of the French administration in dealing with the demands necessary for the authorization of new pesticides. In the eyes of the general public, this failure seriously undermined the Ministry of Agriculture's credibility with regard to its real efforts to assure the coherence of the authorization process and thus protect human health and the environment. Policy-makers, therefore, need to provide *adequate human and financial resources in order to design efficient regulatory procedures for risk governance and thus reinforce their ability to effectively manage risks.*

In summary, our study built on the theoretical background of post-normal science and the sociology of scientific knowledge. In the field of KQA tool development and precautionary risk governance, we introduced a new conceptual distinction between scientific uncertainty and the social construction of uncertainty. We also developed six knowledge quality criteria that can be used in the assessment of information communicated in an argumentative public process. In the field of discourse analysis, our approach confirmed the relevance of using the 'tetrahedron of governance for sustainability' as an innovative method for the systematic analysis of the stakes that form the context of discourses on risks. The case study confirmed the assumptions of the sociology of scientific knowledge regarding the key role of context in knowledge production and use. In the field of environmental sciences, the study described an innovative socioeconomic approach to a class of new pesticides (systemic insecticides) and to the emergence of new risks. Finally, in the field of precautionary risk governance, we were able to add two additional lessons to the twelve already developed by the EEA.

6. Conclusions

Based on the French controversy over the risk that the systemic insecticide Gaucho® forms for honeybees, this paper explored the phenomenon of the social construction of uncertainty and its role in discourses on risk governance. Our case analysis clearly demonstrated that the social, economic, and institutional stakes of the actors involved in the controversy strongly shaped the discursive strategies used to cope with uncertainties. Typical phenomena observed in this risk controversy were: the strategic and selective use of risk information; the use of outdated and disproved methods (not meeting state-of-the-art detection limits), and of inappropriate regulatory approaches (dose per hectare acute toxicity is inadequate for systemic insecticides); the systematic omission of local knowledge, denial of its relevance, and discrediting it as 'unscientific' (beekeepers' local knowledge of their honeybees' symptoms); the blurring of the debate by presenting data irrelevant to the case; the use of language tricks and semantic slips, and suggesting (undue) imprecision; the persistent exclusion of key expertise and competence in expert committees that advise on market authorization (very low representativeness of honeybee experts in the Committee for Toxic Products, including the Honeybee group).

To remedy these major flaws in discourse that hamper effective and timely precautionary risk governance and timely recognition of and response to early warnings, we proposed six knowledge quality criteria that can assist in the assessment of the information communicated in an argumentative public process. They are as follows: reliability of the information – it must be based on all available scientific knowledge; robustness of the information – it must take into account criticism; use of the information produced by other stakeholders; relevancy of the arguments for issue under debate; logical coherence of the discourse; and legitimacy of the information source.

We compared our findings with the twelve lessons of the EEA (*Late lessons from early warnings*) and concluded that many of these 'late' EEA lessons can also be drawn from the present case. Further, the imidacloprid/honeybee case allowed us to draft two additional lessons:

- Update risk assessment methods to fit new risks
- Assure adequate institutional capacity for efficient administrative procedures of risk governance

All of these lessons should be applied to future policies in order to minimize the repetition of past mistakes.

Finally, conclusions can be drawn about the capacity of contemporary democracies to answer societal demands. Principles of democracy, social equity, ecological responsibility – all of these challenge the liberal criteria for decision-making: financial profits – but for whom? profitability of agriculture and industry – at the cost of the profitability of beekeeping? and at what social and environmental price? The case of Gaucho® versus honeybees is symbolic for the actual crisis (sign of a transformation?) frequently seen in representative democracies.

Acknowledgements

We thank Joachim Spangenberg, Jean-Marc Douguet and two anonymous reviewers for useful comments on an earlier version of this paper. We are grateful to Laura Cobb for linguistic and stylistic improvements.

References

Abeilles/tournesol. Compte rendu de la Réunion Abeilles/tournesol du 24.10.1997. Paris: ACTA; 1997. 10 pp.

Abeilles/tournesol. Compte rendu de la Reunion technique du 31 juillet 1998 à Luçon; 1998. 3 pp.

Alétru F. Observations description et analyse des troubles comportementaux des abeilles sur cultures de tournesol; 2003. 16 pp.

AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments). Analyse des phénomènes d'affaiblissement des colonies d'abeilles. Paris: AFSSA; 2002. 102 pp.

Assouline G, Joly P-B. Rhône Poulenc Agrochimie: an uncertain future. AgBioForum, J Agrobiotechnol Manage Econ 2001;4(1):26–33.

Bayer. Expert overview on Imidacloprid, with reference to Cox, Caroline (2001), Insecticide Factsheet/Imidacloprid. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (NCAP). J Pestic Reform 2001;21(1):15–21.

Bayer Cropscience. Dossier Abeille et agriculture, Dossier Gaucho et les abeilles. http://www.bayercropscience.fr. Last visited in January 2006.

Beck U. Risk society, towards a new modernity. London, Newbury Park: Sage Publ.; 1992. first published in 1986, 260 pp.

Belzunces L, Tasei J-N. Rapport sur les effets des traitements de semences de tournesol au Gaucho® (imidaclopride). Impacts sur les peuplements des colonies d'abeilles et sur les miellées. Paris: Commission d'Etude de la Toxicité des Produits Antiparasitaires à Usage Agricole et des Produits assimilés, Ministère de l'Agriculture; 1997. 27 pp.

Bonmatin J-M, Bengsch ER, Moineau I, Lecoublet S, Colin ME, Fleche C. Effets des produits phytosanitaires sur les abeilles, Programmes 1999 et 2000. Rapport de résultats no. 3 au. Paris: Ministère de l'Agriculture et de la Pêche; 2000. 32 pp.

Bonmatin J-M, Marchand PA, Charvet R, Moineau I, Colin ME. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. J Agric Food Chem 2005;53:5336–41.

Brown G, Yule G. Discourse analysis. Cambridge textbooks in linguistics. Cambridge University Press; 1983. 288 pp.

Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honeybees in France. J Econ Entomol 2006;99(2):253–62.

Chambre d'Agriculture des Deux Sèvres. Enquete miel de tournesol; 2000. 5 pp.

Chambre d'Agriculture de la Vendée, FDSEA de la Vendée, FDSEA des Deux Sèvres. Résultats de l'étude sur le problème de la chute de récolte de miel de tournesol (1996–1999); 1999. 1 pp.

Comité de prévention et de la Précaution. Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires; 2002. Paris, Available at: http://www.fne.asso.fr/PA/eau/dos/CPP_Phytos.pdf.

De Marchi B, Ravetz JR. Risk management and governance: a post-normal science approach. Futures 1999;31:743–57.

Donkers R. Reach – the European Union proposal for chemicals management. 9th annual CMS workshop, San Francisco; 2005. Available at: http://www.chemicalstrategies.org/pdfs/Presentations_05/RDonkers_REACH_Breakout_5.pdf.

Dunn WN. Using the method of context validation to mitigate type III errors in environmental policy analysis. In: Hisschemöller M, Hoppe R, Dunn WN, Ravetz JR, editors. Knowledge, power, and participation in environmental policy analysis. Policy studies review annualNew Brunswick: Transaction Publishers; 2001. p. 417–36.

EEA (European Environmental Agency). Late lessons from early warnings. Copenhagen: EEA; 2001. 211 pp.

Elbert A, Beckert B, Hartwig J, Erdelen C. Imidacloprid – a new systemic insecticide. Pflanzenschutz Nachr 1991;44:113–36.

Elie Y, Garaud R. Témoin gênant. Movie produced by Planète Future and France 3 Ouest; 2003. 55 mn.

Fairclough N. Discourse and social change. Cambridge, UK: Polity Press; 1992. 259 pp.

Fairclough N, Wodak R. Critical discourse analysis. In: Van Dijk TA, editor. Discourse as structure and process, vol. 2. London: Sage; 1997. p. 258–84.

Faucheux S, Nöel J-F. Les menaces globales sur l'environnement. Paris: La Découverte; 1990. 124 pp.

GVA (Galerie Virtuelle Apicole). Apiservices – Le Portail Apiculture. Dossier Intoxications. www.beekeeping.com. Last checked on 20th February 2006.

Fischer F, Forester J, editors. The argumentative turn in policy analysis and planning. Durham, NC: Duke University Press; 1993. 352 pp.

Funtowicz SO, Ravetz JR. Uncertainty and quality in science for policy. Dordrecht: Kluwer; 1990. 229 pp.

Funtowicz SO, Ravetz JR. Science for the post-normal age. Futures 1993;25(7):735–55.

Funtowicz S, Strand R. Models of science and policy. In: Traavik T, Li Ching L, editors. Genetic engineering and genetically modified organisms: precautionary approaches to risk and uncertainty, Tapir Academic Press, Trondheim, Norway. In press.

GEM-ONIFLHOR. Audit de la filière miel: Partie I. Reactualisation des Donnees Economiques Issues de l'audit 1997; 2005. 67 pp.

Habermas J. Theory of communicative action: Volume 1. Reason and the rationalisation of Society. Boston: Beacon Press; 1984.

Habermas J. Theory of communicative action: Volume 2. System and lifeworld: a critique of functionalist reason. Boston: Beacon Press; 1987.

Halm MP, Rortais A, Arnold G, Taséi JN, Rault S. A new risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honeybees and imidacloprid (Gaucho®). Environ Sci Technol 2006;40:2448–54.

Hajer MA. The politics of environmental discourse. Oxford: Oxford University Press; 1995. 348 pp.

Hicks B. Aventis – a new leader in life sciences. Pestic Outlook 2000;11(3):116–8.

Hellström T. The Science–Policy dialogue in transformation: model-uncertainty and environmental policy. Sci Public Policy 1996;23(2):91–7.

Kloprogge P, van der Sluijs JP, Petersen A. A method for the analysis of assumptions in assessments: exploring the value-ladenness of two indicators in the Fifth Dutch Environmental Outlook. Report commissioned by: Netherlands Environmental Assessment Agency (MNP). Report published by: Netherlands Environmental Assessment Agency (MNP), Bilthoven and Unit Science, Technology and Society, Copernicus Institute, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands, 2005, 69 pp.

Irwin A. Sociology and the environment. Cambridge: Polity Press; 2001. 210 pp.

Jasanoff S, Markle GE, Petersen LC, Pinch TJ. Handbook of science and technology studies. Thousand Oaks: Sage; 1995. 820 pp.

Maïz'Europ'. L'importance économique de la filière semences de maïs. http://www.agpm.com/marche_eco/chiffres_production_mais.php#I0000924f. Last visited in April 2006.

Majone G. Evidence, argument, and persuasion in the policy process. New Haven, CT: Yale University Press; 1989. 190 pp.

Michaels D. Industry groups are fighting government regulation by fomenting scientific uncertainty. Doubts is their product. Sci Am 2005:96–101.

Nelkin D, editor. Controversy. Politics of technical decisions. Newbury Park: Sage Publications; 1992. 258 pp.

Nowotny H, Scott P, Gibbons M, Salomon J-J. Re-thinking science, knowledge and the public in an age of uncertainty. Cambridge, Polity: Malden, MA, Published in the USA by Blackwell, 2001, 278 pp.

OECD. OECD environmental outlook for the chemicals industry; 2001. 168 pp.

O'Connor M. Building knowledge partnership with ICT? Some lessons from GOUVERNe and VIRTUALIS. Saint-Quentin-en-Yvelines: Cahier du C3ED, vol. 06-01. 2006. p. 11–2.

Parlement Wallon. Compte-rendu analytique de la séance publique de la Commission de l'Environnement, des Ressources Naturelles et de la Ruralité. Séance de 12 February; 2004. Available at: www.menacechimique.be.

Phillips N, Hardy C. Discourse analysis: investigating processes of social construction. Sage University Papers Series on Qualitative Research Methods, vol. 50. Thousand Oaks, CA: Sage; 2002. 97 pp.

Ravetz JR. Scientific knowledge and its social problems. London: Oxford University Press; 1971. 449 pp.

Rortais A, Arnold G, Halm M-P, Touffet-Briens F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 2005;36:71–83.

Saltelli A, Chan K, Scott M. Sensitivity analysis. Probability and statistics series. John Wiley & Sons Publishers; 2000. 475 pp.

Saltelli A, Tarantola S, Campolongo F, Ratto M. Sensitivity analysis in practice: a guide to assessing scientific models. John Wiley & Sons Publishers; 2004. 219 pp.

Suchail S, Belzunces LP, Vaissière BE. Toxicité aiguë de l'imidaclopride et de ses métabolites chez l'abeille domestique Apis mellifera. Abeilles Fleurs 2003;643:27–30.

SCT (Scientific and Technical Committee for the Multifactor Study of the Honeybee Apiaries Decline). Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho®) et troubles des abeilles, rapport final. Paris: Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires Rurales; 2003. Available at: http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/rapportfin.pdf, 106 pp.

UNESCO. The precautionary principle. Paris, France: UNESCO; 2005. 54 pp. Available at: http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001395/139578e.pdf.

Van Dijk TA. Discourse, power and access. In: Caldas-Coulthard CR, Coulthard M, editors. Text and practices. Readings in critical discourse analysis. London: Routledge; 1996. p. 84–104.

Van Dijk TA. The study of discourse. In: Van Dijk TA, editor. Discourse as structure and process, vol. 1. London: Sage; 1997a. p. 1–35.

Van Dijk TA. Discourse as interaction in Society. In: Van Dijk TA, editor. Discourse as social interaction, vol. 2. London: Sage; 1997b. p. 1–37.

Van der Sluijs J.P. Anchoring amid uncertainty; on the management of uncertainties in risk assessment of anthropogenic climate change. Ph.D. Thesis. Universiteit Utrecht, 1997, 260 pp.

Van der Sluijs JP. Chapter 2.1. Uncertainty, assumptions, and value commitments in the knowledge base of complex environmental problems. In: Guimarães Pereira Â, Guedes Vaz S, Tognetti S, editors. Interfaces between science and society. London: Greenleaf; 2006. p. 67–84.

Van der Sluijs JP. Uncertainty and precaution in environmental management: insights from the UPEM conference. Environ Model Softw 2007;22(5):590–8.

Walker WE, Harremoës P, Rotmans J, Van der Sluijs JP, Van Asselt MBA, Janssen P, et al. Defining uncertainty. A conceptual basis for uncertainty management in model-based decision support. Integr Assess 2003;4(1):5–17.

Webler T. "Right" discourse in citizen participation: an evaluative yardstick. In: Renn O, Webler T, Wiedemann P, editors. Fairness and competence in citizen participation. Technology, risk and society. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995. p. 35–86.

Wildavsky AB. Speaking truth to power, the art and craft of policy analysis. Boston, Mass.: Little, Brown; 1979. 431 pp.

Wynne B. Uncertainty and environmental learning. Glob Environ Change 1992;2:111–27.

Bijensterfte, oorzaken en gevolgen

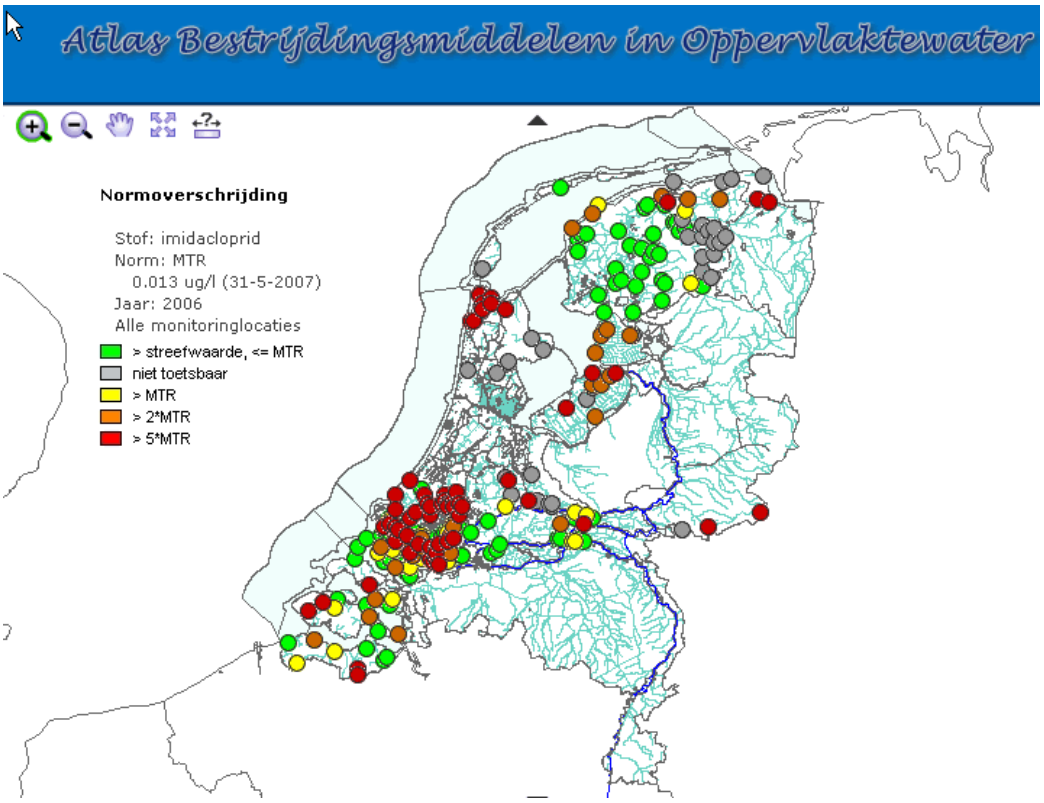
Home

Imidacloprid in alarmerende hoeveelheden in het Nederlandse oppervlaktewater

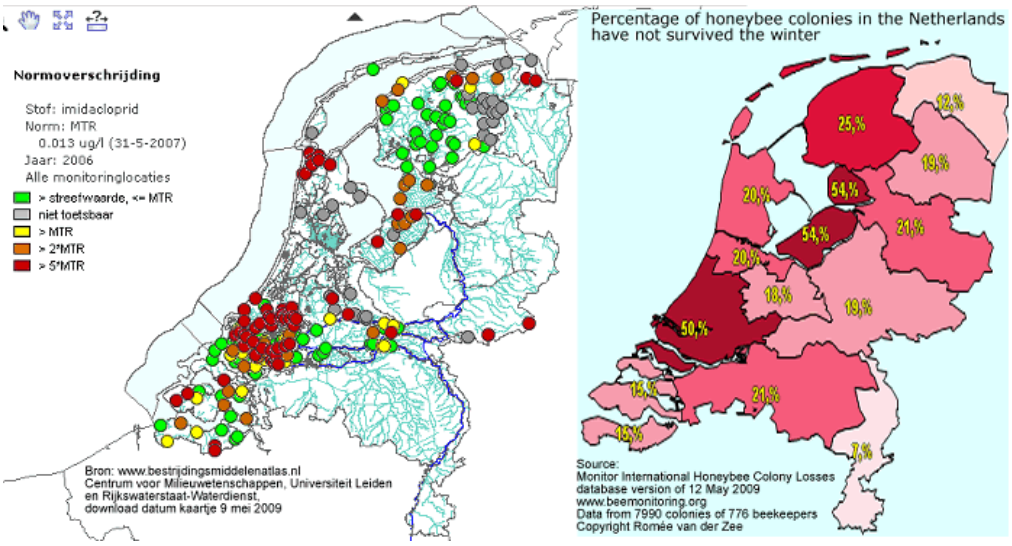
za, 05/09/2009 - 18:34 — webmaster

[Bijgewerkt op 19 mei 2009]
In een rapport van Alterra uit 2006 zijn emissies van bestrijdingsmiddelen uit de Nederlandse land- en tuinbouw in kaart gebracht. De **normoverschrijdingen zijn het ergst bij de bloembollenteelt en de glastuinbouw**.

Het rapport heeft niet naar de risico's voor bijen gekeken maar heeft wel veel voor de bijenhouderij alarmerende concentraties imidacloprid in het oppervlaktewater gevonden. Via bloeiende planten langs de slootkanten kunnen bijen er aan worden blootgesteld en ook via planten die water krijgen uit vervuilde sloten. **Omdat imidacloprid een systemisch insecticide is wat zeer effectief door de wortels wordt opgenomen en in de sapstroom van de plant terecht komt, zijn de te verwachten concentraties in de planten (en dus pollen en nectar) in deze gebieden naar verwachting aanmerkelijk hoger** dan de concentraties in het water, en die zijn al zeer alarmerend. **Bovendien fourageren bijen ook rechtstreeks op water en voeden het broed hiermee. Op sommige meetpunten zit de concentratie imidacloprid in het water maar liefst 300 keer boven het Maximaal Toelaatbaar Risiconiveau** (MTR = 0.013 µg/L voor Imidacloprid, waarden van 4 µg/L zijn gemeten).
Er zijn 218 metingen in 2006 die boven de 5*MTR uitkomen (de rode stippen op onderstaande kaart), uitgaand van de 2006 MTR van 0.013 µg/l. De mediaan is 0.31 µg/l (dus op **de helft** van de rode punten op de kaart zit imidacloprid **24x of meer boven de MTR**) en het gemiddelde van de rode stippen is 0.49 µg/l (dus **gemiddeld** zit op een rode stip op de kaart de concentratie **37x boven de MTR norm**).



Kaart van **normoverschrijdingen Imidacloprid in Nederlands Oppervlaktewater 2006**
Bron: Bestrijdingsmiddelenatlas
[Centrum voor Milieuwetenschappen, Universiteit Leiden en Rijkswaterstaat-Waterdienst, download datum kaartje 9 mei 2009]



Op het bovenstaand plaatje rechts de actuele sterftecijfers van bijenvolken zoals Romée van der Zee die heeft gevonden voor het jaar 2008 in haar monitoringprogramma. (**Imkers van Nederland:** het is **cruciaal** voor ons wetenschappers dat jullie de vragenlijsten van Romée invullen of je nu veel of weinig sterfte hebt, we hebben ALLE gegevens nodig, liefst van alle imkers, anders komen we er niet uit! - de link met imidacloprid is een hypothese en nog geen wetenschappelijk vastgesteld verband in Nederland, we willen weten of we op het goede spoor zitten of dat we deze factor uit kunnen sluiten en dat kan alleen met monitoringgegevens. Jullie medewerking is erg belangrijk.)

Meer nu over de gemeten overschrijdingen van het toegestane imidaclopridgehalte in Nederlands Oppervlaktewater. In een reeks documenten vonden we alarmerende feiten:

Uit het boven genoemde Alterra rapport:
- Er worden regelmatig **concentraties tussen 1 en 4 µg/L** gevonden. Omdat imidacloprid het hele jaar wordt aangetroffen wordt snel aan de glastuinbouw gedacht.
- Er zijn recentelijk middelen op de markt die soortgelijke eigenschappen hebben als imidacloprid. Dus daarmee zijn vergelijkbare waterkwaliteitsproblemen te verwachten.

Imidacloprid in de bloembollen
In bloembollenteeltgebieden wordt imidacloprid in normoverschrijdende hoeveelheden aangetroffen in oppervlaktewater. Imidacloprid wordt in bloembollen voornamelijk toegepast door boldompeling voor het planten, maar gewasbespuitingen komen ook voor.

Imidacloprid in akkerbouw en vollegrondsgroenteteelt
De stof imidacloprid (Amigo) wordt toegepast in de pootaardappelteelt tegen luis. Dit vindt plaats door een rijenbespuiting tijdens het poten soms i.c.m. moncereen (combinatiepakket heet MonAmi). In de teelt van suiker- en voederbieten, maïs, kool en sla wordt imidacloprid (Gaucho) als zaadcoating ingezet tegen bietenkevertjes, -aardvlo en –vlieg, luis, ritnaalden, cicade. In kool wordt de stof bovendien als traybehandeling (Admire) toegepast. Beide toepassingen in kool hebben in 2006 een vrijstelling.

Het gebruik op trays met koolplanten wordt als de belangrijkste route in de akkerbouw/vollegrondsgroenten aangemerkt. Het risico ontstaat, doordat na het spuiten het middel afgeregend wordt i.v.m. kans op schade. Hierbij is het risico van emissie naar het oppervlaktewater groot. Deze behandeling vindt zowel bij de plantenkwekers als telers plaats.

Imidacloprid in fruitteelt
Imidacloprid (Admire) is **toegestaan in appels en peren. Het heeft geen (etiket)beperking wat betreft het gebruiksvoorschrift (geen emissiebeperkende toedieningsmethode verplicht).** In de fruitteelt wordt het 1 á 2- maal per jaar ingezet tegen luizen en wantsen. Volgens de CLM-milieumeetlat heeft het middel geen MBPwaarde, de MTR echter is bijzonder laag (0,013 ug/l). **Dat betekent dat bij bespuitingen in het voorjaar druppeldrift (standaard driftcijfer 17%) direct tot een overschrijding van de MTR kan leiden.** De verwachting op basis van de hoge driftcijfers voor fruit is dat druppeldrift veruit de belangrijkste emissieroute voor deze stof is voor wat betreft fruitteelt. Oplossingsrichtingen zouden dan ook voornamelijk gericht moeten zijn op het terugdringen van druppeldrift.

Imidacloprid in glastuinbouw
De stof wordt in de glastuinbouw in de vorm van de producten Admire en Gaucho ter bestrijding van insecten (bladluizen en wittevliegen) toegepast. Deze stof heeft een toelating als gewasbehandeling tijdens de opkweek van diverse vruchtgroentegewassen op kunstmatig substraat. In dezelfde gewassen heeft imidacloprid een toelating gedurende de teelt op kunstmatig substraat, maar het mag nu alleen worden meegedruppeld via het voedingssysteem. In de sierteelt heeft het een toelating in o.a. roos en gerbera op kunstmatig substraat en mag het als gewasbehandeling worden gebruikt in grondteelten van o.a. chrysant en potplanten. Binnen de glastuinbouw is daarnaast de zaadbehandeling van sla toegelaten. **De belangrijkste emissieroutes zijn: uitspoeling door afdruipen van gewas, spuien van drainwater, lozing van condenswater en luchtemissie.** Wat condenswater betreft zijn cijfers beschikbaar bij PPO en bij Delfland. Van spuien van drainwater (frequentie, concentraties, volumes) zijn geen goede gegevens beschikbaar.

Imidacloprid wordt toepast in bijna de volledige arealen van groenten en sierteelt
- Bij druppeldosering per plant is de dosering per ha hoog; 500-800 g/ha.
- Een schoon (insectenvrij) product aanleveren bij veiling is nodig. Daarom vindt aan het eind van de teelt vaak nog een toepassing van insecticide plaats.

Monitoringsresultaten

- **In alle glastuinbouwgebieden komt imidacloprid in te hoge concentraties in het oppervlaktewater voor.**
- **Delfland meet in glastuinbouwgebied 0.01 tot 1.47 ug/L in oppervlaktewater in januari. In water is imidacloprid slecht afbreekbaar (halfwaardetijd van 30-160 dagen).**
- **Combinatie van brede toepassing in glastuinbouwgebieden (geconcentreerd), trage afbraak in water en de lage MTR leidt tot veel overschrijdingen.**

Bron: H.A.E. de Werd, W.H.J. Beltman & R.C.M. Merkelbach, 2006. Puntbelastingen in de gewasbescherming, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving en Alterra
Download het hele rapport

Probleemgebieden in Nederland met veel imidacloprid in het oppervlaktewater volgens andere rapporten:

Imidacloprid, dat vanaf 2004 in alle bolgewassen door middel van boldompeling mag worden toegepast, blijkt in toenemende mate een probleem te vormen in het oppervlaktewater van vooral het **Noord-Hollands Zandgebied**.
Bron: Tweede rapport waterkwaliteit bloembollenstreek

Ook in **Flevoland** en in de **Harmelerwaard** (met veel nieuwe moderne glastuinbouw) overschrijdt het gehalte aan imidacloprid in oppervlaktewater veelvuldig de norm.
Bronnen:
Flevoland: Situatie waterkwaliteit Zuiderzeeland 2006-2007
Harmelerwaard: Situatie waterkwaliteit rijnlanden in 2004

login of registreer om te reageren Beleid Imidacloprid

Reacties

Nieuwe MTR voor imidacloprid

di, 05/19/2009 - 14:31 — webmaster

De MTR voor imidacloprid is in 2008 verhoogd van 0.013 µg/l naar 0.067 µg/l. Merkwaardig genoeg is bij de onderbouwing van die herziening geheel niet gekeken naar de toxiciteit voor bijen. Dit had wel moeten gebeuren omdat bekend is dat al bij 0.1 nanogram per bij sublethale effeten waarneembaar zijn.

Zie tabel 8 van het RIVM rapport Environmental risk limits for imidacloprid voor de MTR normen voorgesteld per 2008.

De wijze waarop zulke normen tot stand komen is in dit RIVM rapport terug te vinden:
Guidance for the derivation of environmental risk limits within the framework of 'International and national environmental quality standards for substances in the Netherlands' (INS)

Zie ook:
C. Bodar en E. Smit: Nieuwe normen voor bestrijdingsmiddelen: schoner water? H2O 24, 2008. Pags 53-55.

login of registreer om te reageren

Website onder redactie van Natuurwetenschap en Samenleving, Copernicus Instituut voor Duurzame Ontwikkeling en Innovatie, Universiteit Utrecht
Heeft u relevante kennis of ervaring over bijensterfte of tips of links die u via deze website wilt delen, neem dan contact op per e-mail: webmaster[at]bijensterfte.nl
Colofon
Drupal